

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Fecha 25-5-1993

ENTRADA NUM. 745

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Y

BIOLOGIA MOLECULAR

T  
12  
123

Prof.  
T-14/11/16

Evaluación bioquímica de diferentes técnicas de conservación  
del fruto del chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.)

TESIS DOCTORAL

José Manuel Lahoz Garzón

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	<u>51963814</u>
Nº Copia	<u>21212703</u>

Universidad de Granada

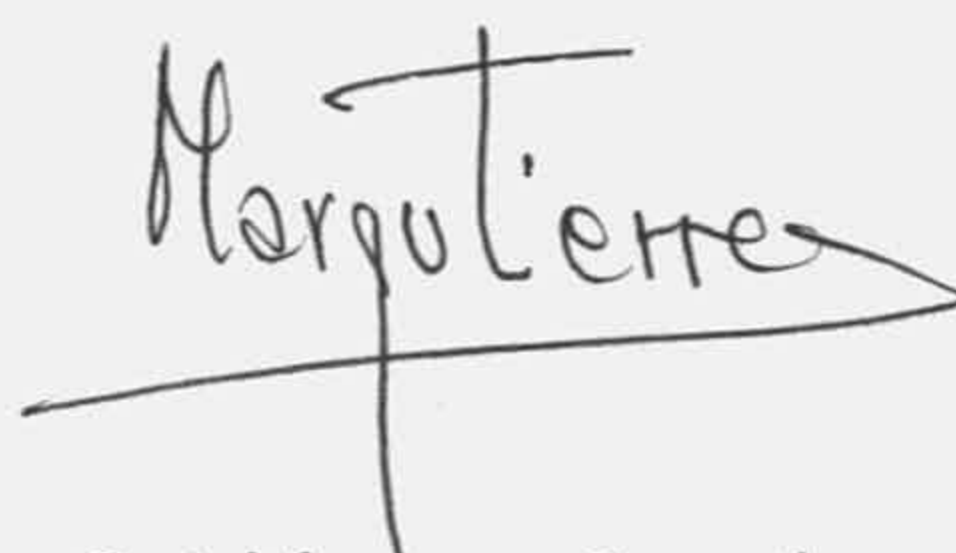
1993

Memoria presentada por el Licenciado José Manuel Lahoz Garzón para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas, dirigida por el Dr. Alberto M. Vargas Morales y la Dra. Margarita Gutiérrez García.

Directores:

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Alberto Vargas", enclosed within a large, loopy circular flourish.

Alberto M. Vargas Morales

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Margarita", with a long horizontal line extending to the right from the bottom of the signature.

Margarita Gutiérrez García

Licenciado:

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "José Manuel Lahoz Garzón", with a long horizontal line extending to the right from the bottom of the signature.

José Manuel Lahoz Garzón

La parte experimental de este trabajo se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada durante los cursos académicos 1986-87, 1987-88 y 1988-89. La memoria se ha redactado en 1993.

Su realización ha sido posible gracias a la Financiación de la Caja Rural de Granada, con la que se firmó un Contrato de Investigación para la realización del Proyecto titulado: "Estudio Bioquímico de la maduración del Fruto del Chirimoyo. Influencia de Distintos Agentes en la Prolongación de la Vida Comercial a Escala Semiindustrial".

Mis primeros pasos como investigador, en un trabajo anterior a éste, los di de la mano del Prof. Alberto Vargas. Posteriormente, su impulso fue decisivo para la gestación del proyecto de investigación en el que se enmarca esta memoria. Quiero agradecerle a Alberto su labor como director de investigación, su participación personal en el trabajo experimental y bibliográfico, su papel como fuente de soluciones sencillas e imaginativas y, especialmente, su muy contagioso buen humor durante el trabajo.

Con la Dra. Margarita Gutiérrez he compartido muchas horas en el laboratorio. Tengo que agradecerle su valiosa participación en el trabajo experimental. Además, su dirección y apoyo han sido fundamentales en la redacción de esta memoria.

A D. Francisco Alvarez, mi amigo y paisano, quiero agradecerle la ilusión que demostró por la realización de este trabajo cuando era sólo una idea. Su buen hacer como presidente de PROCAM, S. C. A. hizo posible la puesta en marcha del proyecto de investigación del que forma parte esta memoria.

La realización de este trabajo no habría sido posible sin el concurso de otras personas que, de una u otra forma y en mayor o menor medida, han participado en él. Tengo que agradecerles la colaboración en algunos experimentos a las Dras. M<sup>a</sup> del Mar Sola y Marina Martínez-Cayuela. También ellas y mis compañeros de laboratorio los Dres. Rafael Salto y Javier Oliver han supuesto una valiosa ayuda ante los problemas que habitualmente surgen durante el trabajo en el laboratorio. Quiero agradecerles especialmente su habilidad para crear un ambiente de trabajo agradable.

Finalmente, quiero agradecer al Dr. José Manuel Egea, del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, de Murcia, la ayuda prestada en el tratamiento estadístico de los resultados.

Le dedico esta Memoria a mi madre, a quien nunca podré compensar suficientemente por todo lo que me ha dado.

Nada hay realmente importante excepto  
que te lata el corazón.

Camilo José Cela.

## ABREVIATURAS

AcP	fosfatasa ácida.
ACC	ácido 1-aminociclopropano carboxílico.
ALAT	alanina aminotransferasa.
ASAT	aspartato aminotransferasa.
CA	atmósfera controlada.
cv.	cultivar
DNS	ácido 2,3-dinitrosalicílico.
DPO	difenol oxidasa.
DTR	días tras la recolección
E.C.	Comisión de Enzimas.
EDTA	ácido etilén-diamino-tetraacético.
EDTANa <sub>4</sub>	sal tetrasódica del ácido etilén-diamino-tetraacético.
FID	detector de ionización de llama.
G-6-P	glucosa-6-fosfato.
G-6-PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
L-Ala	L-alanina.
L-Asp	L-aspartato.
LDH	lactato deshidrogenasa.
MA	atmósfera modificada.
MDH	malato deshidrogenasa.
min	minuto.
mM	10 <sup>-3</sup> molar.
mm Hg	milímetros de mercurio como unidad de presión.
NAD	nicotín adenín dinucleótido.
NADH	nicotín adenín dinucleótido reducido.
NADHNa <sub>2</sub>	sal disódica del NADH.
NADP	nicotín adenín dinucleótido fosfato.
NADPH	nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido.
NADPHNa <sub>2</sub>	sal disódica del NADP.
ng	10 <sup>-9</sup> gramos.
nl	10 <sup>-9</sup> litros.
nm	10 <sup>-9</sup> metros.
PEBD	polietileno de baja densidad.
6-PG	6-fosfogluconato.
6-PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa.
p-NPP	p-nitrofenilfosfato.
PPO	polifenol oxidasa.
PVPP	polivinilpolipirrolidona.
rpm	revoluciones por minuto.
S.E.M.	error estándar de la media.

## ABREVIATURAS

SST	sólidos solubles totales.
U	unidad de actividad enzimática.
$\alpha$ -CG	alfa-cetoglutarato.
$\alpha$ -CGK <sub>2</sub>	sal dipotásica del $\alpha$ -CG.
$\epsilon$	coeficiente de extinción molar.
$\mu$ l	10 <sup>-6</sup> metros.
$\mu$ m	10 <sup>-6</sup> metros.
$\mu$ M	10 <sup>-6</sup> molar.
$\mu$ mol	10 <sup>-6</sup> moles.
1.000 x g	1.000 veces la aceleración gravitatoria de la Tierra.



## INDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION .....	5
II. ANTECEDENTES .....	9
II.1. Maduración y senescencia .....	9
II.2. Fisiología de la maduración de frutos .....	11
II.3. Maduración de frutos climatéricos .....	12
II.3.1. El climaterio respiratorio .....	12
II.3.2. Clasificación de los frutos según su velocidad máxi- ma de producción de etileno .....	15
II.3.3. Control de la maduración por reguladores de creci- miento. Importancia del etileno .....	15
II.3.4. Las membranas celulares durante la maduración .....	17
II.3.5. Expresión génica durante la maduración de frutos: síntesis de RNA y de proteínas .....	18
II.3.6. Las paredes celulares durante la maduración .....	19
II.3.7. El papel del calcio .....	24
II.4. Técnicas de conservación de frutos .....	25
II.4.1. Factores ambientales que influyen en la acción y producción del etileno .....	25
II.4.2. Efecto de la temperatura sobre la maduración. Refri- geración de los frutos .....	26
II.4.3. Métodos de conservación basados en la restricción de la disponibilidad de oxígeno por los frutos .....	32
II.4.3.1. Conservación en atmósfera controlada .....	33
II.4.3.2. Conservación en atmosfera modificada mediante el uso de envoltorios plásticos .....	38
II.4.3.3. Control de la atmósfera interna de los frutos mediante recubrimientos céreos o similares ..	39
II.4.3.4. Almacenamiento hipobárico .....	40
II.4.4. Trampas de etileno .....	41
II.4.5. Inhibidores de la biosíntesis y acción del etileno .	42
II.4.6. Irradiación .....	43
II.4.7. Prevención de infecciones micóticas .....	43
III. MATERIAL Y METODOS .....	47
III. 1. Material .....	47
III.1.1. Especie ensayada .....	47
III.1.2. Aparatos .....	48
III.1.3. Reactivos .....	49
III.2. Métodos .....	50
III.2.1. Tratamientos experimentales de los frutos .....	50
III.2.1.1. Lavado de los frutos .....	50
III.2.1.2. Tratamiento con fungicidas .....	50
III.2.1.3. Tratamientos térmicos .....	51

III.2.1.4.	Tratamientos hipobáricos .....	52
III.2.1.5.	Conservación en atmósfera hipóxica autogenerada .....	52
III.2.1.6.	Incubación con etileno .....	53
III.2.1.7.	Tratamiento con ácido cloroetil fosfónico (Ethrel) .....	53
III.2.2.	Determinación de la concentración tisular y producción de etileno .....	54
III.2.3.	Determinación de etanol en mesocarpio .....	57
III.2.4.	Determinación de sólidos solubles totales y pH de mesocarpio .....	58
III.2.5.	Determinación de textura en mesocarpio .....	58
III.2.6.	Determinación de distintas actividades enzimáticas en mesocarpio .....	59
III.2.6.1.	Alanina aminotransferasa .....	61
III.2.6.2.	Aspartato aminotransferasa .....	62
III.2.6.3.	6-fosfogluconato deshidrogenasa .....	64
III.2.6.4.	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa .....	65
III.2.6.5.	Fosfatasa ácida .....	66
III.2.6.6.	Amilasa .....	68
III.2.6.7.	Polifenol oxidasa .....	70
III.2.6.8.	Catalasa .....	71
III.2.7.	Determinación de proteínas .....	73
III.2.8.	Tratamiento estadístico de los resultados .....	73
IV.	RESULTADOS .....	75
IV.1.	Infecciones micóticas post-recolección .....	75
IV.1.1.	Infecciones micóticas en frutos no tratados con fungicidas .....	75
IV.1.2.	Tratamientos con fungicidas .....	76
IV.2.	Estudio de la maduración en condiciones normales: 20 y 23°C .....	78
IV.3.	Efecto de la refrigeración a distintas temperaturas sobre la maduración .....	85
IV.3.1.	Inercia térmica de los frutos .....	86
IV.3.2.	Refrigeración a temperatura constante: 12°C .....	87
IV.3.3.	Refrigeración a temperatura constante: 10°C .....	93
IV.3.4.	Refrigeración a 10°C, 9'5°C y 9°C .....	99
IV.3.5.	Refrigeración a temperatura constante: 4°C .....	99
IV.3.6.	Refrigeración a temperatura de 4°C seguida de incubación con etileno .....	102
IV.3.7.	Conservación a temperaturas cambiantes .....	103
IV.3.7.1.	Premaduración a 23°C seguida de refrigeración a 1 y a 4°C .....	103
IV.3.7.2.	Premaduración a 20°C seguida de refrigeración a 1 y a 4°C .....	108
IV.3.7.3.	Premaduración a 12°C seguida de refrigeración a 1 y a 4°C .....	112
IV.3.7.4.	Refrigeración intermitente a 8'5°C .....	118
IV.3.8.	Preenfriamiento rápido .....	121
IV.3.8.1.	Preenfriamiento rápido a 1°C seguido de maduración a 23°C .....	121

IV.3.8.2. Preenfriamiento rápido a 1°C seguido de conservación a 12°C .....	126
IV.4. Conservación en atmósferas hipobáricas .....	130
IV.5. Conservación en atmósferas hipóxicas autogeneradas .....	132
IV.5.1. Conservación en frascos de vidrio herméticos .....	133
IV.5.2. Conservación en envoltorios de polietileno de baja densidad (PEBD) de 20 µm de espesor .....	135
IV.5.3. Conservación en envoltorios de varias capas de PEBD de 3 µm de espesor .....	139
IV.5.4. Conservación en envoltorios de PEBD de 3 µm .....	140
IV.5.5. Conservación mediante recubrimientos céreos .....	143
V. DISCUSION .....	147
V.1. El papel del etileno en la maduración de las chirimoyas ...	147
V.2. La refrigeración como método de conservación de las chirimoyas .....	149
V.3. Otras técnicas de conservación .....	171
VI. CONCLUSIONES .....	179
VII. REFERENCIAS .....	181

# **INTRODUCCION**

## I. INTRODUCCION.

El chirimoyo (Annona cherimola Mill.), una de las diferentes especies cultivadas de la familia de las Anonáceas, es de gran importancia económica para la franja costera de la provincia de Granada, donde está bien implantado, aunque son los valles de los ríos Verde y Guadalfeo las zonas con mayor superficie dedicada a su cultivo.

La expansión de su cultivo está limitada, ya que para su adecuado crecimiento y, sobre todo, fructificación, requiere unas condiciones microclimáticas especiales, que afortunadamente se dan en nuestra costa, siendo fundamentales la ausencia de cambios bruscos de temperatura, sobre todo heladas, y altos valores de humedad relativa. Sin embargo, gracias a los estudios sobre polinización artificial cuya aplicación práctica está muy extendida en la actualidad, se ha incrementado la productividad de los árboles y la calidad de los frutos, además de haberse extendido la zona de cultivo potencial.

La única zona de producción de chirimoyas, sus frutos, en Europa es el área a que nos estamos refiriendo, con una superficie total cultivada de unas 2.500 Ha y una producción anual de 30.000 toneladas, por lo que, una vez instaurados los canales oportunos de comercialización, no existe posibilidad de competencia para su distribución en Europa.

Los frutos son multicarpelares, con formas acorazonadas, cónicas u ovals. Pueden encontrarse frutos irregulares debido fundamentalmente a una polinización inadecuada, aunque esto cada vez es menos frecuente dado el auge de la polinización artificial. El tamaño más aceptado en los mercados es el de 250 a 400 gramos por pieza, aunque se producen frutos que superan ampliamente este intervalo por ambos márgenes.

La temporada de recolección se extiende desde mediados de septiembre hasta finales de abril, dependiendo del microclima local, siendo más elevada la producción a finales de noviembre. Debido a la imposibilidad de conservar la fruta en los períodos de máxima producción es inevitable que se produzcan excedentes que el mercado no absorbe o lo hace a bajo precio.

El principal problema para la exportación de estos frutos es-

triba en las características de su maduración. La recolección debe ser manual y debe realizarse cuando cada fruto, individualmente, alcanza su desarrollo fisiológico. Este se caracteriza en su etapa final por un incremento en el contenido hídrico que hace que aumente de tamaño, y produce cambios típicos en el estiramiento de las zonas intercarpelares, así como en su coloración hacia tonalidades verde pálidas. Los frutos no pueden ser recogidos con anterioridad ya que entonces no madurarían adecuadamente. Una vez recolectados deben ser consumidos en un período de 4 o 5 días, ya que son frutos climatéricos que maduran rápidamente y alcanzan pronto la senescencia. Esto dificulta enormemente su comercialización. En la actualidad, la chirimoya se vende casi exclusivamente como fruta fresca, siendo comercializada mayoritariamente en España debido a que no existen métodos adecuados que prolonguen el periodo de maduración y consecuentemente su vida comercial, lo que permitiría su distribución sin riesgos en mercados alejados de la zona de producción y un suministro más uniforme y menos dependiente de los altibajos de producción que, por motivos climatológicos, tienen lugar a lo largo de la temporada de recolección.

Una parte sustancial de la superficie cultivada con chirimoyos está plantada de árboles jóvenes que actualmente no están en plena producción, ya que el cultivo se ha extendido en los últimos años a cotas relativamente altas con la puesta en marcha de nuevos regadíos. El problema de la comercialización se agravará en un futuro próximo, a no ser que se facilite con la adopción de técnicas adecuadas de conservación.

En el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada se han estudiado durante varios años las posibilidades de prolongar la vida comercial del fruto del chirimoyo. Estos trabajos, dirigidos en una primera etapa por el Prof. Fermín Sánchez de Medina Contreras, fueron premiados y subvencionados por la Caja General de Ahorros y Monte de Piedad de Granada. Posteriormente el proyecto Estudio Bioquímico de la maduración del fruto del chirimoyo. Influencia de distintos agentes en la prolongación de la vida comercial a escala semiindustrial, dirigido por el Prof. Alberto M. Vargas, fue subvencionado por la Caja Rural de Granada en Noviembre de 1986. Los resultados incluidos en este trabajo se obtuvieron durante la realización de este último Proyecto de Investigación.

En una primera etapa se procedió a caracterizar la maduración

de estos frutos a temperaturas próximas a las de su zona de origen. Se estudiaron una serie de parámetros indicativos de la maduración para comparar sus valores con los obtenidos a partir de frutos sometidos a diferentes tratamientos para su conservación.

A continuación se han realizado una serie de experimentos para determinar las modificaciones producidas cuando los frutos eran sometidos a diferentes manipulaciones térmicas durante el período de conservación.

Por último, se han estudiado toda una serie de procedimientos complementarios de la refrigeración, algunos de ellos habitualmente utilizados en la conservación de otros frutos o productos hortícolas, para determinar experimentalmente la posibilidad de su uso en chirimoyas, como métodos de conservación.

Durante la realización de este trabajo hemos tenido presente en todo momento, que cualquiera que fuera el método de conservación, éste debía de cumplir una serie de requisitos, siendo el principal el que fuera de fácil aplicación sin que se incrementaran excesivamente los costes de manipulación. También era necesario contar con que los mercados donde finalmente van a ser distribuidos los frutos no poseen necesariamente instalaciones adecuadas para mantener un determinado proceso.

Debido a que buscábamos, en definitiva, un método práctico de conservación, en la mayoría de los casos no hemos realizado un estudio bioquímico exhaustivo de la maduración con cada uno de los tratamientos, sino que una vez estudiadas las características organolépticas de los frutos, y cuando éstas no cumplían unos requerimientos mínimos se desechaba el experimento por su falta de aplicabilidad comercial. Lamentablemente esto sucedió en numerosas ocasiones. Así, métodos utilizados habitualmente para la conservación de peras, manzanas, plátanos, cítricos, etc., no han dado resultados aceptables cuando se aplicaban a las chirimoyas.

En términos positivos, hemos determinado que el único método de conservación útil, por el momento, es el almacenamiento de los frutos previamente tratados con fungicida en cámaras frigoríficas a temperaturas entre 10°C y 12°C, según la época de recolección, ya que por debajo de este límite se producen daños por frío.

En condiciones de refrigeración a 12°C, las chirimoyas pueden

## INTRODUCCION

ser conservadas entre 12 y 14 días después de su recolección, mientras que la refrigeración a 10°C permite la conservación entre 15 y 17 días. Este no es el plazo ideal de 21 días que, según nos manifestó en 1986 D. Francisco Alvarez, entonces presidente de la cooperativa exportadora PROCAM S. C. A., resolvería prácticamente todos los problemas de comercialización derivados del rápido deterioro de las chirimoyas. Sin embargo, si esperamos que facilite su distribución en camiones refrigerados por los mercados europeos sin los inconvenientes derivados de la premura de tiempo con que se trabaja en la actualidad.



## II. ANTECEDENTES.

### II.1. MADURACION Y SENESCENCIA

#### -Terminología empleada.

En la bibliografía sobre maduración de frutos existe cierta arbitrariedad en el empleo de los términos que definen los distintos estados fisiológicos y de desarrollo de los frutos. Watada et al. (1984) han intentado aclarar esta confusión definiendo la maduración (del inglés "ripening") como los cambios que tienen lugar desde las últimas etapas del crecimiento y desarrollo hasta las primeras etapas de la senescencia y que como consecuencia de ellos el fruto adquiere un aspecto característico y/o llega a ser apto para el consumo humano. En esta memoria se utiliza el término "maduración" en el mismo sentido que Watada et al. (1984) utilizan el término "ripening".

El vocablo inglés "maturation" se refiere al proceso de crecimiento y desarrollo del fruto que concluye cuando el fruto ya ha alcanzado su tamaño máximo y comienza a madurar (Adato y Gazit, 1977). En esta memoria se utiliza el término "desarrollo del fruto" en ese sentido. Para evitar confusiones hay que tener en cuenta que algunos autores utilizan (a nuestro juicio de modo erróneo) el término "maturation" en lugar de "ripening" (Terai y Mizuno, 1981).

Leopold (1975) define la senescencia ("senescence") como los procesos degenerativos controlados de modo endógeno que tienen lugar a continuación de la madurez fisiológica o agrícola y conducen a la muerte del tejido. Brady (1987) acepta la primera parte de esta definición de la senescencia pero discute el que todos y cada uno de los procesos que conforman este proceso conduzcan a la muerte del fruto, sugiriendo que la senescencia antes que conducir directamente a la muerte del fruto incrementa la probabilidad de que esto suceda, por ejemplo, por deshidratación o por invasión microbiana. También es posible encontrar el término senescencia ("senescence") utilizado como sinónimo de maduración, aunque otras veces se usa en el sentido de envejecimiento de los frutos tras la maduración (LaRue y Gamburg, 1971; Puschmann et al., 1985). En esta memoria se usa el término "senescencia" en el mismo sentido que Watada et al. (1984) utiliza

el de "senescence", como sinónimo también de sobremadurez ("overripeness") o decadencia ("decay", Lyons *et al.*, 1962), reservando el término "envejecimiento" ("aging") para los procesos degenerativos debidos a lesiones exógenas cuyos efectos se acumulan a lo largo del tiempo (Leopold, 1975; Nooden y Leopold, 1978).

**-Teorías de la maduración.**

Los estudios realizados en la década de los 20 sobre los mecanismos que regulan la maduración de los frutos permitieron a Blackman y Parija (1928) desarrollar la teoría de la resistencia de la organización. Esta sugería que el conjunto de fenómenos que tienen lugar durante la maduración, de carácter fundamentalmente catabólico, eran la consecuencia de la desaparición de las fuerzas que mantenían la compartimentación celular. Esta teoría ha sido, con pocas modificaciones, la dominante durante más de 40 años (Sacher, 1973).

La progresiva acumulación de evidencias experimentales de que la síntesis de proteínas y quizás de RNA (Lopezgómez y Gomezlim, 1993) desempeñan funciones fundamentales en la inducción de la maduración ha hecho surgir una nueva teoría. En ella la maduración se presenta como un proceso dirigido de diferenciación de tejidos. Las nuevas técnicas de biología molecular han permitido que esta teoría sea examinada de una forma precisa; en la actualidad se está produciendo un rápido acúmulo de evidencias experimentales sobre el control directo desde el genoma de la maduración en frutos climatéricos (Brady, 1987; Tucker y Laties, 1984). A pesar de lo anterior, hay pruebas de que la compartimentación celular se modifica durante la maduración. Experimentos recientes sugieren que la oxidación de lípidos y/o los cambios de fase dentro de las membranas contribuyen a cambiar la distribución de metabolitos dentro de la células a medida que la maduración avanza (Brady, 1987). Por consiguiente, no se puede decir que la primera teoría de Blackman y Parija (1928) haya sido totalmente reemplazada por la más actual que establece un control directo de la maduración desde el genoma.

Actualmente son objeto de controversia la forma de interacción entre los cambios en la transcripción y traducción, por una parte, con los cambios en la compartimentación y distribución de metabolitos; también se discute sobre si estos dos tipos de procesos contribuyen de forma independiente o no a la maduración. Brady (1987) ha sugerido la posibilidad de que ambas teorías sean más o

menos correctas y que ambos tipos de mecanismos tengan lugar en mayor o menor grado, dependiendo del tipo de fruto en concreto del que se trate.

## II.2. FISILOGIA DE LA MADURACION DE LOS FRUTOS.

La maduración de los frutos consiste en una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que transforman un fruto totalmente desarrollado pero inmaduro en otro maduro y después en un fruto sobremaduro y en claro proceso de senescencia (Kader, 1980). Los fenómenos que pueden tener lugar durante la maduración de los frutos se citan a continuación:

- Maduración de las semillas.
- Cambios de color, debidos a una degradación de la clorofila, lo que permite que se revelen a la vista los carotenoides preformados (colores amarillos y anaranjados), síntesis "de novo" de carotenoides (color rojo del tomate) y antocianinas (colores azules y rojos) y oxidación y polimerización de fenoles (pardeamiento enzimático).
- Abscisión de los frutos o disminución de la fuerza que es necesario aplicar para separarlos del pedúnculo.
- Aumento de la intensidad respiratoria que normalmente se produce como respuesta a un exceso de etileno. Este incremento respiratorio normalmente es útil para satisfacer los superiores requerimientos energéticos del fruto durante la maduración y está relacionado con la aparición de nuevas actividades enzimáticas, aunque a veces puede entenderse como un simple reflejo del deterioro de los controles de intensidad metabólica.
- Incremento en la velocidad de producción de etileno: suele ser un paso previo para la iniciación de la maduración, aunque en varios frutos puede observarse un exceso de producción de etileno como una manifestación de senescencia.
- Modificaciones en la composición de los lípidos de membrana (Forney, 1990).

## ANTECEDENTES

- Aumento de la permeabilidad de los tejidos.
- Reblandecimiento debido a la degradación de la pared celular.
- Transformación del almidón en azúcares e interconversión de los mismos.
- Cambios en las proteínas, tanto cuantitativos como cualitativos: se sintetizan nuevas enzimas como consecuencia de la expresión de genes inhibidos antes de la maduración.
- Producción de componentes volátiles del sabor y aroma.
- Desarrollo de ceras en la piel.
- Modificaciones en los ácidos orgánicos hidrosolubles, tanto en las proporciones de unos ácidos con respecto a otros como en la acidez total medible.

## II.3. MADURACION DE FRUTOS CLIMATERICOS

### II.3.1. EL CLIMATERIO RESPIRATORIO.

Los frutos denominados climatéricos son aquellos que experimentan una rápida elevación en la intensidad respiratoria al comienzo de su maduración (Miller et al., 1953; Pratt y Goeschl, 1969; Bennett et al., 1987), fenómeno conocido como climaterio respiratorio. Esta elevación alcanza un máximo que marca el fin del climaterio. En el período postclimatérico los frutos comienzan a senescer (Lyons et al., 1962; Burg y Burg, 1962).

Se ha acumulado gran número de evidencias experimentales que indican que el climaterio respiratorio es disparado por la elevación de los niveles tisulares de etileno, ya sea como consecuencia de la elevación de la producción endógena o de una aplicación exógena del gas (Biale et al., 1954; Burg y Burg, 1962; Pratt y Goeschl, 1969; Marei y Crane, 1971; Kato et al., 1977; Vendrell, 1985b). Sin embargo, en distintas especies de Annona entre las que se incluye la A. cherimola Mill, variedad Booth, se ha observado que el comienzo de

la rápida producción de etileno tiene lugar después del inicio del climaterio respiratorio (Brown *et al.*, 1988). Tonutti *et al.* (1991) han observado que es en el mesocarpio del melocotón donde se produce inicialmente el incremento en la velocidad de producción de etileno, observándose posteriormente este incremento en el fruto completo.

Se ha sugerido que la elevación climatérica de la intensidad respiratoria está directamente relacionada con las necesidades anabólicas de la maduración (Richmond y Biale, 1966), lo que parece confirmado por los siguientes hechos que tienen lugar durante el climaterio respiratorio: se produce un incremento de los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato y de las actividades fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, que tienen como consecuencia una intensificación del flujo glucolítico (Lieberman, 1979; Bennet *et al.*, 1987; Beaudry *et al.*, 1987; 1989), a consecuencia del cual se incrementan los niveles de ATP (Solomos, 1983; Bennet *et al.*, 1987). En plátanos se ha observado una elevación del ritmo glucolítico durante el climaterio que continúa en la etapa postclimatérica. El incremento del ritmo gluconeogénico durante el climaterio es muy superior al glucolítico, pero tras el climaterio retorna a niveles similares a los preclimatéricos (Beaudry *et al.*, 1989). En chirimoyas se produce una masiva degradación del almidón que comienza inmediatamente tras la recolección (Gutiérrez *et al.*, 1992; 1993). Durante el 1º DTR el flujo de esqueletos carbonados sigue la vía glucolítica. Posteriormente se induce la gluconeogénesis. En el control de la dirección del flujo participa el ciclo de sustrato establecido entre la fructosa-6-fosfato y la fructosa-1,6-bisfosfato, regulado principalmente mediante cambios en la concentración de fructosa-2,6-bisfosfato (Sola *et al.*, 1993).

El flujo glucolítico continúa elevado después del pico respiratorio climatérico (Beaudry, 1989), lo que mantiene altos los niveles de ATP cuando, según parece, ya han sido sintetizadas la mayor parte de las proteínas necesarias para la maduración (Brady, 1987). Esto significa que el incremento en la intensidad respiratoria suministra una cantidad de energía química superior a las necesidades del tejido.

Otros autores han considerado que el climaterio es la primera manifestación del deterioro de la compartimentación celular (Blackman y Parija, 1928; Solomos y Laties, 1973). En la actualidad estas ideas ya no gozan de una buena aceptación, pero aún no existe una teoría enteramente satisfactoria sobre el sentido fisiológico del

climaterio (Brady, 1987).

**-Respuesta de los frutos climatéricos y no climatéricos a la incubación con etileno.**

Existe una diferencia fundamental entre los frutos climatéricos y los no climatéricos en su comportamiento frente al etileno exógeno. Cuando se incuban con etileno frutos inmaduros pero ya desarrollados, los no climatéricos muestran un incremento en la intensidad respiratoria que es tanto mayor cuanto más elevada es la concentración de etileno exógeno y que cesa cuando se interrumpe la aplicación de etileno. Sin embargo, en frutos climatéricos, la elevación de la intensidad respiratoria no cesa al retirar el etileno exógeno. Además, en frutos climatéricos no hay diferencias significativas en la magnitud del máximo de intensidad respiratoria en un amplio rango de concentraciones de etileno aplicado (Bleinroth, 1975; Lieberman, 1979), aunque el pico respiratorio se alcanza con tanta mayor rapidez cuanto más elevada sea la concentración de etileno exógeno (Tucker y Grierson, 1987). Este comportamiento se comprende fácilmente si se tiene en cuenta que la producción de etileno es autocatalítica (Lieberman, 1979; Vendrell, 1985a).

McMurchie et al. (1972) afirman que existen dos sistemas diferentes de producción de etileno:

a. Sistema I: es el existente tanto en frutos climatéricos como no climatéricos.

b. Sistema II: está presente sólo en frutos climatéricos desarrollados pero inmaduros. En ellos la exposición al etileno produce un masivo incremento en la producción de etileno por los tejidos seguida de maduración y envejecimiento. Este incremento en la producción de etileno se considera una inducción del sistema II.

Antes de que McMurchie et al. (1972) estableciesen la diferencia entre los dos sistemas de producción de etileno se llamaban climatéricos los frutos que exhibían una elevación climatérica de la intensidad respiratoria. Actualmente se utiliza un nuevo criterio de clasificación: se conocen como frutos climatéricos aquellos en los que opera el sistema II de producción de etileno.

### II.3.2. CLASIFICACION DE LOS FRUTOS SEGUN SU VELOCIDAD MAXIMA DE PRODUCCION DE ETILENO.

La capacidad de producción de etileno varía enormemente de unos frutos a otros. Se ha demostrado que tiene actividad biológica a concentraciones en la atmósfera del orden de 0,1 ppm. Por consiguiente, el exceso de producción postclimatérica de etileno en frutos con velocidades de producción de  $C_2H_4$  moderadas, altas o muy altas es un fenómeno de senescencia (Kader, 1980).

#### Clasificación de los frutos según su velocidad máxima de producción de etileno.

Velocidad de producción de $C_2H_4$ ( $\mu l/(Kg \cdot hora)$ a $20^\circ C$ )	FRUTOS
Muy baja: 0,01-0,1	Cereza, cítricos, uva, granada, fresa.
Baja: 0,1-1,0	Kiwi, pimienta, frambuesas, ananás, arándano, caqui.
Moderada: 1,0-10,0	Plátano, higo, breva, melón de miel, mango, tomate.
Alta: 10,0-100,0	Manzana, melocotón, albaricoque, melón, nectarina, papaya, pera y ciruela.
Muy alta: > 100,0	Chirimoya, pasionaria, sapote, mamey.

### II.3.3. CONTROL DE LA MADURACION POR REGULADORES DE CRECIMIENTO. IMPORTANCIA DEL ETILENO.

El etileno ha sido considerado durante muchos años como el agente que dispara la maduración de los frutos o como la hormona de la maduración (Burg y Burg, 1962), la cual pone en marcha reacciones asociadas al proceso de maduración (Marei y Crane, 1971). De hecho, la aplicación de etileno exógeno se ha utilizado para conseguir una más rápida y uniforme maduración en papayas (An y Paull, 1990),

mangos (Barmore, 1974; Fuchs *et al.*, 1975)), tomates (Pratt y Workman, 1962), plátanos (Ke y Ke, 1980) y aguacates (Proctor y Caygill, 1985), utilizándose también el ethrel en mangos (Barmore, 1974) y plátanos (Henze *et al.*, 1983) porque libera etileno (Morgan, 1969).

Sin embargo, la validez de este concepto ha sido cuestionada para algunos frutos tales como la uva y el tomate. Estas dudas han sido suscitadas por la ausencia de correlación entre la producción de etileno y los fenómenos asociados a la maduración en estos frutos (Lieberman, 1979) o por experimentos en los que la maduración es suprimida o retrasada por la aplicación de auxinas (ácido indol-3-acético y ácido 2,3-diclorofenoxiacético) a pesar de observarse un incremento en la producción de etileno (Vendrell, 1969; Frenkel y Dick, 1973; Vendrell, 1985b). El comportamiento de la granada es extremo, pues se trata de un fruto no climatérico que sólo desprende trazas de etileno ocasionalmente; si estos frutos se tratan con etileno se puede observar un rápido pero transitorio incremento respiratorio, pero no hay efecto sobre los demás parámetros de maduración (Ben-Aire *et al.*, 1984).

Otros hechos experimentales indican que no es correcta la concepción simplista que supone considerar al etileno como una hormona que dispara la maduración de los frutos independientemente de la acción de otros factores presentes en las plantas. Algunos frutos, como por ejemplo el aguacate, no maduran mientras permanecen unidos al árbol. Una vez que son recolectados, su sensibilidad al etileno se incrementa con el tiempo transcurrido tras la recolección. Este hecho sugiere la existencia de un inhibidor de la maduración producido en el árbol pero no en el fruto, donde es degradado de modo lo suficientemente lento como para ejercer su acción inhibidora mientras el fruto permanece unido al árbol y durante algún tiempo después (Biale y Young, 1971).

El efecto inductor y acelerador de la maduración que ejerce el etileno parece estar asociado a interacciones con auxinas, giberelinas, citoquininas y ácido abscísico, aunque la relación de este último regulador del crecimiento con la maduración de los frutos tiene un apoyo experimental dudoso (Brady, 1987). Disponemos de un conocimiento bastante vago de los mecanismos involucrados en estas interrelaciones, pero existen evidencias que sugieren un antagonismo general entre el etileno por una parte y las auxinas, giberelinas y citoquininas por otra (Lieberman, 1979; Brady, 1987). Probablemente



ninguna hormona actúe de modo aislado en la puesta en marcha de cualquier proceso fisiológico principal durante el ciclo vital de una planta. A pesar de estas controversias el etileno es considerado como la hormona más influyente en el control del proceso de maduración de los frutos.

#### II.3.4. LAS MEMBRANAS CELULARES DURANTE LA MADURACION.

Distintos investigadores han intentado obtener datos que permitan averiguar si las membranas celulares de los frutos sufren o no alteraciones estructurales y funcionales durante la maduración. Una forma de abordar este problema ha sido el estudio de los cambios que sufren los lípidos de membrana durante la maduración en distintos frutos, pero sus conclusiones no pueden tomarse como definitivas porque no tienen en cuenta la capacidad de las células para contrarrestar los efectos de un aumento de permeabilidad mediante el uso del transporte activo u otros medios (Brady, 1987).

Un enfoque distinto ha sido el siguiente razonamiento apoyado en hechos experimentales: se ha observado que la síntesis de algunos enzimas (poligalacturonasa en tomates y celulasa en aguacates) tiene lugar durante la maduración y continúa en el fruto ya maduro. Eso significa que en estos frutos existe un sistema ribosomal funcional y de hecho se han obtenido polisomas de frutos maduros (Speirs et al., 1984; Tucker y Laties, 1984). Los polisomas necesitan, para su estabilidad y funcionamiento, que se cumplan de modo estricto una serie de condiciones iónicas que aparentemente se cumplen en el interior del citoplasma de los frutos maduros. Esto significa que el plasmalema y el tonoplasto mantienen sus funciones al menos hasta que tiene lugar la síntesis neta, el procesado y la exportación de los enzimas que hidrolizan la pared celular. De todo esto puede extraerse la conclusión de que la integridad de las estructuras que manifiestan una permeabilidad selectiva se mantiene incluso en aguacates y tomates bastante maduros (Brady, 1987).

Los estudios de la ultraestructura de aguacates y tomates en maduración también conducen a la misma conclusión (Platt-Aloia y Thomson, 1981; Themmer et al., 1982). Sin embargo, en chirimoyas se ha observado una intensa degradación del plasmalema y del resto de las membranas en epicarpio y mesocarpio en frutos muy maduros (Gutiérrez et al., 1992).

En resumen, las pruebas experimentales disponibles indican que las células de algunos frutos no sufren una pérdida masiva de la compartimentación celular durante la maduración, pero puede existir una cierta tendencia hacia una permeabilidad creciente de las membranas (Brady, 1987). Sin embargo, en otros frutos sí se produce una profunda pérdida de la compartimentación celular.

### II.3.5. EXPRESION GENICA DURANTE LA MADURACION DE FRUTOS: SINTESIS DE RNA Y PROTEINAS.

El concepto de maduración como proceso de diferenciación de tejidos controlado desde el genoma se apoyó en sus inicios en distintos experimentos realizados en aguacates que mostraban un incremento de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en las primeras etapas del climaterio (Richmond y Biale, 1966; 1967). Sin embargo, la posible introducción de artefactos derivados del uso de cortes de tejido cuestionó la validez de estos resultados.

Con posterioridad y gracias al empleo de técnicas de inmunoprecipitación han aparecido pruebas de cambios en la síntesis de proteínas durante la maduración. Concretamente, se ha podido determinar que los incrementos de actividad  $\beta$ -1:4 glucanohidrolasa (celulasa) en aguacates (Christoffersen *et al.*, 1984) y de invertasa (Iki *et al.*, 1978) y poligalacturonasa en tomates (Brady *et al.*, 1982; Tucker y Grierson, 1982; Tucker *et al.*, 1980) se deben a incrementos en la cantidad neta de proteína. Los contenidos celulares en estas proteínas hidrolíticas aumentan debido a cambios en sus velocidades de síntesis y degradación y no como resultado de la activación de una molécula precursora sintetizada durante el anterior desarrollo del fruto.

Mediante el empleo de técnicas de hibridación Christoffersen *et al.* (1984) demostraron que el RNA mensajero del péptido precursor de la celulasa en aguacates multiplicó su concentración por un factor de 50 durante la maduración. Resultados similares se han obtenido en tomates con respecto a los niveles de poligalacturonasa y del RNAm que codifica a su precursor (Brady, 1987). Estos trabajos muestran una evidencia directa de la existencia de un control desde el genoma de la síntesis de proteínas durante la maduración.

### **-La síntesis de proteínas durante el climaterio.**

En muchos frutos se ha podido determinar un incremento en la síntesis de proteínas en los primeros momentos del climaterio (Sacher, 1973; Drouet y Hartmann, 1982; Tucker y Laties, 1984). Este incremento en la síntesis de proteínas parece estar ligado al aumento de la intensidad respiratoria (Brady y O'Connell, 1976; Tucker y Laties, 1984). Otros resultados experimentales sugieren que al incremento en la síntesis de proteínas durante el climaterio le sigue una disminución durante las últimas etapas de la maduración, aunque esta afirmación aún necesita ser confirmada.

### **II.3.6. LAS PAREDES CELULARES DURANTE LA MADURACION.**

#### **-Estructura de las paredes celulares.**

La composición de las sustancias poliméricas de la pared celular en dicotiledóneas está bien establecida: hay aproximadamente un 30 % celulosa, 30 % de hemicelulosa, 35 % de pectinas y un 5 % de proteínas (Fry, 1988), aunque la abundancia relativa de los componentes puede variar considerablemente (McNeil et al., 1984). Estructuralmente las paredes celulares de los frutos parecen similares a la pared primaria de otros órganos, excepto posiblemente en que siendo más ricas en pectina pueden contener mayor proporción de lámina media o pared primaria (Knee y Bartley, 1981).

Se han propuesto varios modelos diferentes para la estructura de la pared celular (Keegstra et al., 1973; Lamport, 1986; Fry y Miller, 1989) que han sido profusamente revisados (McNeill et al., 1984; Carpita, 1987; Bacic et al., 1988; Fry, 1988; Varner, 1989). Sin embargo, todos los modelos tienen en común la existencia de microfibrillas de celulosa recubiertas con una capa de hemicelulosa y todo el material fibrilar embebido en una matriz de polímeros pécticos. La estructura se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre las cadenas de celulosa y hemicelulosa y por uniones covalentes entre la hemicelulosa y las pectinas (Darvill et al., 1980; Fischer y Bennett, 1991). Algunos autores afirman que la celulosa contribuye de modo importante a la resistencia mecánica de las paredes celulares (Fischer, 1991). Sin embargo, en frutos completamente reblandecidos se ha observado una degradación de los componentes de

la matriz no celulósica, habiendo desaparecido la macroestructura celulosa-hemicelulosa-pectinas pero conservándose intactas las fibras de celulosa (Mcmann et al., 1990). Esto indica que la celulosa de modo aislado es incapaz de mantener la textura de modo significativo y que la elevada textura de muchos frutos inmaduros se debe a la estructura global de la pared celular, no a la suma aislada de las contribuciones de cada constituyente.

Las proteínas de la pared pueden tener función estructural, enzimática u otras funciones como resistencia a las infecciones (McNeil et al., 1984). La extensina es uno de los principales componentes de la fracción protéica de la pared y se caracteriza por estar enriquecida en residuos de prolina. Se ha sugerido que la extensina podría estar unida a la pectina formando complejos extensina-pectina que constituirían otro tipo de polímeros en la pared (Cooper et al., 1984).

**-El reblandecimiento de los frutos: cambios estructurales y enzimas implicados.**

En la mayoría de los frutos la maduración va acompañada de una disminución de su textura, pero la velocidad y el grado de reblandecimiento alcanzado son diferentes para cada especie y variedad. Este fenómeno tiene una inmensa importancia económica, pues la vida comercial de los frutos después de la recolección está en gran parte limitada por su reblandecimiento: los frutos blandos se dañan con más facilidad durante su manipulación y son también más sensibles a la aparición de enfermedades infecciosas (Brady, 1987; Tucker y Grierson, 1987).

Estudios microestructurales han demostrado que durante la maduración se producen cambios en la pared celular que explican el reblandecimiento (Huber, 1983). Se ha observado una disolución de la lámina media en tomates (Crookes y Grierson, 1983) que además va acompañada de la dispersión de las estructuras fibrilares en aguacate (Pesis et al., 1978; Platt-Aloia et al., 1980) o de su desintegración en peras y chirimoyas (Ben-Arie et al., 1979; Gutiérrez et al., 1992). Este tipo de cambios en las paredes celulares no tiene lugar durante la senescencia de las hojas y aparentemente sólo sucede en los frutos y quizás en las zonas de abscisión (Brady, 1987).

Además de los cambios en la ultraestructura, los estudios bio-

químicos realizados han revelado que el reblandecimiento va normalmente acompañado por un notable incremento de la actividad de distintas hidrolasas capaces de degradar componentes específicos de la pared celular. Simultáneamente se observan concentraciones elevadas de azúcares y polisacáridos pécticos solubles de menor tamaño molecular que los constituyentes de la pared, es decir los productos de las reacciones de las hidrolasas (Bartley y Knee, 1982; Huber, 1983; Hobson, 1980; DellaPenna *et al.*, 1986; Grierson y Tucker, 1983).

Estos cambios observados durante la maduración son el resultado de la acción de los enzimas degradativos de la pared (Labavitch, 1981; Huber, 1983). Los principales enzimas implicados en el proceso de reblandecimiento son las poligalacturonasas (endo y exo-enzimas) y las carboximetil celulasas, cada una de las cuales alcanza altos niveles en algunos frutos, pero no en todos (Fischer y Bennet, 1991). Otros enzimas que juegan papeles más o menos notables son las pectinesterasas y otras hidrolasas de las cuales las más importantes son las galactosidasas ( $\alpha$  y  $\beta$ ).

Distintos investigadores han observado una correlación entre el incremento de los niveles de poligalacturonasas y la degradación de la lámina media en aguacates (Awad y Young, 1979; Platt-Aloia *et al.*, 1980), peras (Ben-Aire *et al.*, 1979) y tomates (Crookes y Grierson, 1983). Estos enzimas catalizan la rotura hidrolítica de enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  en polímeros de galacturonano, fragmentando las pectinas. Se han caracterizado dos formas de poligalacturonasa: exo- y endo-enzima en papaya (Chan y Tam, 1982) y otros frutos. En melocotones de la variedad "clingstone" sólo se ha encontrado exo-poligalacturonasa (Postlmayr *et al.*, 1966; Pressey y Avants, 1973a). Este enzima permanece en niveles muy bajos durante el desarrollo de los melocotones "clingstone" y se elevan de modo dramático durante la maduración (Downs y Brady, 1990), por lo que se ha asociado al limitado reblandecimiento que experimentan estos frutos. Por otra parte, en la variedad "freestone" se encuentran el endo- y el exo-enzima y tanto los niveles de pectinas solubles como el reblandecimiento alcanzado son más elevados. En otros frutos hay una correlación entre la aparición de endo-poligalacturonasa y el comienzo del reblandecimiento (Huber, 1983; Mowlah y Itoo, 1983; Paull y Chen, 1983; Paull *et al.*, 1983). Debido a estos y otros trabajos parecía estar suficientemente demostrado que en muchos frutos la endo-poligalacturonasa es la responsable primaria de la degradación de las pectinas y el reblandecimiento asociado a la maduración (Huber, 1983; Bennett y DellaPenna, 1987; Brady, 1987). Sin embargo, un

reciente trabajo en kiwi sugiere que en primer lugar se produce una solubilización de las pectinas sin alterar su estructura primaria y posteriormente comienzan a actuar los enzimas endopoligalacturonasa y  $\beta$ -galactosidasa (Regdwell *et al.*, 1992).

Durante la maduración de los tomates se expresan 3 isoenzimas de endo-poligalacturonasa: PG-1, PG-2a y PG-2b (Pressey y Avants, 1973b; Ali y Brady, 1982). Su papel no está todavía claro (Baldwin y Pressey, 1988), pero se sabe no obstante que la PG-1 aparece en un estado temprano de la maduración, mientras que las PG-2 se elevan cuando ésta avanza (Brady *et al.*, 1985).

La síntesis de poligalacturonasa es inducida en tomates por el etileno, produciéndose simultáneamente el reblandecimiento del fruto, la síntesis de licopeno y la descomposición de la clorofila; todos estos hechos se producen durante la respiración climatérica (Grierson y Tucker, 1983). Se ha observado que estos fenómenos son dependientes del etileno, tanto para su iniciación, como para su posterior desarrollo (Jeffery *et al.*, 1984; Mizrahi *et al.*, 1975).

A pesar de que, como antes se ha citado, las poligalacturonasas son en muchos frutos los responsables primarios de su reblandecimiento, Giovannoni *et al.* (1989) han observado un proceso de degradación de poliuronidos por poligalacturonasa que tiene lugar en tomates transgénicos *rin* sin reblandecimiento del fruto. Por otra parte, en el mesocarpio de los melones no se ha detectado actividad poligalacturonasa durante el reblandecimiento del mismo (Hobson, 1962; Lester y Dunlap, 1985; McCollum *et al.*, 1989). Estos hechos junto con otros observados en mango (Mitcham y McDonald, 1992) indican que es necesario considerar procesos adicionales (enzimáticos o no) para explicar el fenómeno del reblandecimiento.

La poligalacturonasa es más activa degradando pectinas desmetiladas que metiladas (Pressey y Avants, 1982; Seymour *et al.*, 1987; Koch y Nevins, 1989). Por consiguiente, la pectinmetil esterasa (pectinesterasa), un enzima que cataliza la demetilación del grupo carboxílico C-6 de los residuos galacturonosilo de las pectinas, puede jugar un importante papel facilitando el ataque de la poligalacturonasa a las pectinas (Fischer y Bennett, 1991). Se ha encontrado pectinesterasa en cantidades notables en muchos frutos, tanto maduros como verdes, a diferencia de lo que sucede con la poligalacturonasa. El incremento de su actividad, durante la maduración, es muy pequeño comparado con el de la poligalacturonasa (Tucker y

Grierson, 1987). Se ha calculado que los niveles de pectinesterasa encontrados en algunos tejidos del fruto serían capaces de desesterificar las pectinas ácidas en cuestión de minutos (Brady *et al.*, 1976).

Las Cx-celulasas son enzimas caracterizadas por su capacidad de degradar carboximetilcelulosa (Cx-celulosa). Hasta ahora no se ha confirmado que esta celulasa pueda degradar celulosa cristalina, habiéndose observado, sin embargo, que el xiloglucano, presente en aguacate, es sustrato *in vitro* de la Cx-celulasa de aguacate (Hatfield y Nevins, 1986). Las celulasas de los frutos pueden formar un grupo de enzimas que actúen sobre distintas hemicelulosas con enlaces  $\beta(1 \rightarrow 4)$  (Fischer y Bennett, 1991). Se ha encontrado actividad celulasa en gran variedad de frutos, pero no se ha detectado ni en peras (Ahmed y Labavitch, 1980), ni en manzanas (Bartley, 1976). El nivel de actividad celulasa crece con la maduración (Bartley y Knee, 1982; Huber, 1983). Sin embargo, los niveles finales de actividad difieren mucho de unos frutos a otros.

Se han descrito otras hidrolasas de pared celular, como la xilanasa de papaya (Paul y Chen, 1983) o la  $\beta$ -glucosidasa de mesocarpio de melón (Ranwala *et al.*, 1992) que incrementan su actividad durante la maduración. No se excluye la posibilidad de que haya otros enzimas implicados en el fenómeno del reblandecimiento de los frutos.

#### **-El reblandecimiento de los frutos en relación con el control de la maduración.**

Aunque es poco probable que la hidrólisis de la pared tenga un papel iniciador en la maduración de los frutos climatéricos (Tigchehaar *et al.*, 1978), los genotipos que se reblandecen muy rápido maduran aceleradamente, y los frutos blandos parece ser que senescen rápidamente. Las interrelaciones entre pared y sucesos intracelulares han sido poco estudiadas. La maduración es considerada, a menudo, como una serie de sucesos independientes, quizás coordinados por el sistema 2 del etileno, pero operando en paralelo. De acuerdo con este punto de vista, la expresión del sistema 2 del etileno induce, entre otros, la síntesis de enzimas hidrolíticos de la pared, los cuales causarían su reblandecimiento. Existe, sin embargo, la posibilidad de que el citoplasma esté influenciado por un cambio en el estado físico y químico de la pared. Una conse-

cuencia del reblandecimiento podría ser la liberación de proteínas previamente inmovilizadas en la pared. Una segunda posibilidad consistiría en la liberación de oligómeros de carbohidratos, los cuales podrían actuar desencadenando la producción de etileno y otras respuestas de estrés. Los cambios en las propiedades de la pared modificarían el equilibrio hídrico en los tejidos del fruto y contribuirían a la redistribución de solutos en los compartimentos del tejido (Tucker y Grierson, 1987).

### II.3.7. EL PAPEL DEL CALCIO.

El calcio a bajas concentraciones afecta a las membranas celulares, a las proteínas de membrana (Paliyath y Poovaiah, 1985; Ragothama *et al.*, 1985) y actúa como segundo mensajero (Hepler y Wayne, 1985). El calcio también retrasa y a veces suprime la maduración de los frutos, aumentando su textura (Ferguson, 1984; Glenn *et al.*, 1988) y disminuyendo su intensidad respiratoria y la producción de etileno (Richardson y Al-Ani, 1982) pero este efecto sólo se consigue a concentraciones mucho más elevadas que las necesarias para observar los efectos mencionados en primer lugar. Esto sugiere que el calcio retrasa la maduración de los frutos mediante un mecanismo de acción grosero, quizás actuando sobre la pared celular. Esta interpretación es coherente con el hecho siguiente: la actividad enzimática potencial de las proteínas que soportan las actividades poligalacturonasa y pectín metil esterasa es mucho mayor que la que manifiestan *in vivo*. Por consiguiente, el ataque a los poliuronidos de la pared celular parece estar muy restringido. Hay pruebas experimentales de que el calcio limita la hidrólisis de la pared celular de los tomates (Brady *et al.*, 1985; Buescher y Hobson, 1982). En hojas ejerce un retraso de la senescencia mediante la protección de los lípidos de membrana frente a la degradación (Cheour *et al.*, 1992), pero no se sabe si se ejerce el mismo efecto en frutos.

Algunas de las funciones desempeñadas por el calcio parecen estar relacionadas con su estado y distribución en el fruto. Saks *et al.* (1990) han hallado una correlación positiva entre el contenido en calcio soluble en agua y la no aparición de determinados daños por frío en manzanas almacenadas, mientras que esa correlación no existe para el contenido en calcio total.



## II.4. TECNICAS DE CONSERVACION DE FRUTOS.

### II.4.1. FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUYEN EN LA ACCION Y PRODUCCION DEL ETILENO.

Al estudiar la influencia de distintos factores sobre la producción de etileno hay que tener en cuenta que el parámetro experimental que se determina es la velocidad a la que el gas emana del fruto. Existe indudablemente una relación entre la concentración tisular de etileno, parámetro que determina su actividad biológica, y la velocidad a la cual este gas abandona el fruto. Burg y Burg (1962) establecieron a este respecto la existencia de un gradiente de concentración de etileno bastante elevado entre la pulpa inmediatamente adyacente al epicarpio y la atmósfera contigua. Este gradiente se debe principalmente a la elevada resistencia a la difusión que ofrece el epicarpio y se ve muy poco afectado por la concentración de etileno en la atmósfera que rodea al fruto, lo cual está de acuerdo con la ley de Fick para la difusión de gases a través de una barrera.

Elevados niveles de  $\text{CO}_2$  pueden inhibir, promover o no tener efecto sobre la producción de etileno por los frutos (Abeles, 1973). Burg y Burg (1967) publicaron pruebas experimentales de que la expresión de la actividad biológica del etileno necesita que éste se enlace a un metal, posiblemente el Zn. El  $\text{CO}_2$  es un inhibidor competitivo de esta actividad biológica: retrasa la maduración de los frutos al desplazar al etileno de su centro receptor (Burg y Burg, 1967 y 1969).

Burg y Burg (1967; 1969) también demostraron que el etileno necesita  $\text{O}_2$  para su actividad biológica y sugirieron que el enlace del etileno a su centro receptor se ve impedido cuando la concentración de  $\text{O}_2$  disminuye por debajo del 8 % a presión atmosférica. La producción de etileno también se ve reducida cuando los niveles de  $\text{O}_2$  son bajos: el  $\text{O}_2$  es necesario para la transformación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, precursor metabólico del  $\text{C}_2\text{H}_4$  (Adams y Yang, 1979). Una concentración baja de  $\text{O}_2$  puede retrasar la maduración de los frutos inhibiendo tanto la producción como la acción del  $\text{C}_2\text{H}_4$ .

La producción de etileno también muestra una marcada dependen-

cia de la temperatura, habiéndose observado un incremento en la producción de etileno entre 0 y 25°C (Kader, 1980).

#### II.4.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MADURACION. REFRIGERACION DE LOS FRUTOS.

La temperatura influye poderosamente sobre la velocidad a la que tiene lugar la maduración. Los frutos recolectados maduran tanto más rápidamente cuanto más elevada sea la temperatura (An y Paull, 1990), dentro de un cierto intervalo para cada fruto. Por encima de la temperatura máxima de ese intervalo, que se sitúa para muchos frutos entre los 30 y 35°C, tiene lugar una maduración anómala, pudiendo aparecer sabores extraños en la pulpa, cambios de color irregulares, reblandecimiento no uniforme (An y Paull, 1990; Akamine, 1977), o incluso inhibición de la producción de etileno (Klein, 1989), del reblandecimiento (Klein *et al*, 1990) y del conjunto de la maduración.

##### -Refrigeración de los frutos.

La temperatura es el factor ambiental aislado que mayor efecto ejerce sobre la velocidad a la que tiene lugar la maduración. La refrigeración suele permitir un retraso en la maduración y de este modo se prolonga la vida comercial de los frutos.

La calidad del fruto depende en gran parte de la temperatura de conservación. Durante la refrigeración la mayoría de los frutos evoluciona, más o menos lentamente, hacia una pérdida de calidad medida en términos de disminución de la textura de la pulpa, reducción en el contenido de ácidos orgánicos y azúcares, disminución del aroma de los frutos, pérdidas de peso por transpiración, posible aparición de podredumbres fúngicas y también de alteraciones fisiológicas, tales como el escaldado, "bitter pit" y otras (Durán, 1983d).

Sin embargo, existen distintas variedades de peras y ciruelas que necesitan un cierto tiempo de almacenamiento bajo refrigeración sin el cual no maduran de un modo homogéneo. Este fenómeno podría estar relacionado con los estudios de Blankenship y Richardson (1985), que han observado que la actividad del enzima formador de

etileno (EFE) en peras D'Anjou se ve incrementada durante la refrigeración.

#### **-Temperatura óptima de conservación.**

Es aquella a la que un fruto se conserva durante más largo tiempo experimentando las menores pérdidas de calidad posibles. Normalmente es deseable mantener los frutos a una temperatura inmediatamente superior a la que puedan sufrir daños por frío (Jamieson, 1980). No existe una temperatura óptima para cada fruto, ni siquiera para cada variedad, pues varía dependiendo del grado de desarrollo o madurez alcanzado en el momento de la recolección, del régimen de temperaturas e insolación sufrido por la fruta durante su desarrollo, de la posición de los frutos en el árbol y de factores nutricionales tales como el régimen de lluvias o riegos (la humidificación del suelo poco antes de la recolección disminuye la resistencia de los frutos al frío), el plan de abonado seguido y las características edafológicas de la plantación (Durán, 1983b; Casas, 1983; Nakamura *et al.*, 1987; Saks *et al.*, 1990). También depende esta temperatura óptima del tiempo que se pretenda conservar la fruta, pues los daños aparecen después de un cierto tiempo de conservación que varía con la temperatura.

Cuando la refrigeración tiene lugar a temperaturas superiores a la óptima de conservación, la maduración sufre un retraso inferior al que podría haberse obtenido en caso de utilizar una temperatura más baja. Este retraso en la maduración es tanto menor cuanto más elevada sea la temperatura de refrigeración. Además, se producen mayores pérdidas de peso en los frutos y aumenta la incidencia y severidad de las infecciones fúngicas (Durán, 1983d).

#### **-Inercia térmica de los frutos. Preenfriamiento rápido.**

La refrigeración de la fruta a una temperatura determinada plantea el problema de la inercia térmica de los frutos, que puede retrasar de modo significativo la consecución de la temperatura de refrigeración en sus tejidos. Otro problema planteado por la inercia térmica se presenta en las cámaras frigoríficas industriales durante su llenado. La fruta caliente recién introducida en la cámara puede calentar durante varias horas el aire de la misma a varios grados por encima de la temperatura prefijada en el termostato. La conse-

cuencia es que, mientras se estabiliza de nuevo la temperatura, la fruta fría presente en la cámara en el momento de entrada de fruta caliente sufre una elevación de temperatura que puede alterar sus previsiones de conservación (Durán, 1983e; Delhom, 1986). Si el flujo de entrada de fruta caliente en la cámara es suficientemente elevado, el interior de la cámara puede permanecer sobrecalentado incluso durante varios días.

Para evitar los problemas descritos es usual pasar la fruta caliente por una cámara o un túnel de preenfriamiento rápido antes de introducirla en la cámara de conservación. La cámara de preenfriamiento rápido se regula a varios grados por debajo de la temperatura final de conservación de modo que se acelere notablemente el enfriamiento de la fruta.

#### **-Daños por frío.**

Las plantas de las regiones tropicales y subtropicales especialmente y aunque en menor medida también las originarias de zonas templadas, experimentan una disfunción fisiológica cuando son expuestas a bajas temperaturas. Este fenómeno es de gran importancia dado que la conservación de los frutos y vegetales a bajas temperaturas es uno de los métodos más comunes empleados para retrasar la maduración post-cosecha. Se conocen como daños por frío las alteraciones fisiológicas y organolépticas que sufren los frutos como resultado de su exposición a temperaturas bajas (pero siempre superiores a la temperatura de congelación de los tejidos) durante períodos de tiempo más o menos largos y que van en detrimento de su calidad (Saltveit y Morris, 1990). La temperatura por debajo de las cuales se producen estos daños depende de cada fruto, pero suele estar comprendida entre 0 y 12°C.

Se llama **temperatura crítica** de conservación de un fruto (también conocida como temperatura de seguridad) a la temperatura mínima a la cual puede ser refrigerado sin que aparezcan daños por frío. La temperatura crítica varía en función del tiempo de refrigeración (Autio y Bramlage, 1986), especie y variedad del fruto (Kader, 1980). Para períodos de conservación prolongados la temperatura crítica de los frutos tropicales suele estar entre 10 y 12°C (MacDonald, 1989; Chan, 1988), 7°C para los frutos subtropicales (Paull, 1990), pudiendo disminuirse hasta 0°C para muchos frutos de zonas templadas (Cotter *et al.*, 1991; Fallahi *et al.*, 1985). Hay excepcio-

nes notables a esta generalización, como la aparición de daños por frío en atemoyas que maduran a 15°C (Broughton y Tan, 1979).

La severidad de los daños aumenta al disminuir la temperatura de refrigeración (Abdel-Maksoud *et al.*, 1974) y al prolongarse la exposición al frío (Autio y Bramlage, 1986), entre otros factores.

Se cree que la refrigeración prolongada de un fruto bajo su temperatura crítica origina un fenómeno que actúa como causa primaria desencadenante de una serie de consecuencias fisiológicas y físicas que finalmente dan lugar a síntomas observables directamente de modo visual u organoléptico (Saltveit y Morris, 1990). Las poliaminas putrescina y espermidina están relacionadas con los daños por frío, pero aún no se sabe qué papel desempeñan (McDonald, 1989). En chirimoyas se ha observado que durante la maduración a temperaturas que no producen daños por frío se produce un intenso incremento de los niveles de putrescina previo al máximo de producción de etileno. Sin embargo, a 6°C, temperatura a la que los frutos sufren daños por frío y no maduran, no tiene lugar la elevación de los niveles de putrescina (Escribano y Merodio, 1993).

Los síntomas de daños por frío se manifiestan con frecuencia después de trasladar los frutos desde la temperatura a la que han sufrido daños a otra no dañina (Paull, 1990). Se ha observado que los tomates conservados largo tiempo por debajo de 12,5°C sufren daños por frío (Morris, 1982). Sin embargo, los síntomas causados por el daño no se manifiestan hasta que son expuestos a una temperatura de alrededor de 20°C (Saltveit y Cabrera, 1987).

Actualmente no se conoce ningún parámetro fisiológico o síntoma visual único que permita determinar la existencia o no de daños por frío (Miller y Risse, 1986). Por el contrario, los síntomas pueden ser muy diferentes de una especie a otra. Los síntomas más comúnmente observados se ofrecen a continuación (Saltveit y Morris, 1990):

- Cambios celulares:** alteraciones en la estructura y composición de las membranas, cese de los movimientos de protoplasma y lisis celular.
- Alteraciones metabólicas:** incrementos anormales en la producción de etileno y el ritmo respiratorio frecuentemente observables sólo tras el retorno a temperatura más elevada. Aumento de los niveles de metabolitos producidos en anaerobiosis y otros metabolitos anormales.

**-Lesiones superficiales:** pueden consistir en:

-picado ("bitter pit"): pequeñas (< 5 mm de diámetro) depresiones circulares de color marrón y consistencia similar a la del corcho que aparecen en el epicarpio, observadas en cítricos (Casas, 1983), manzanas (Durán, 1983a) y otros frutos.

-escaldado ("scald"): manchas de color pardo de contorno irregular y difuso, observado en papaya (Harvey y Chang, 1988), cítricos (Casas, 1983), etc.

También es frecuente observar extensas zonas deprimidas en el epicarpio de los pimientos (Miller y Risse, 1986), cicatrices rugosas en el extremo distal del tomate (Sherman y Allen, 1981), pérdidas de electrolitos en papayas (Chan et al., 1985) y decoloración del epicarpio. Las zonas afectadas por este último síntoma suelen reblandecerse más rápidamente que el resto del fruto, siendo de este modo más susceptibles al ataque de microorganismos (Couey, 1977).

**-Encharcamiento de los tejidos:** la pérdida de la integridad de las membranas y la lisis celular provocan la formación de un exudado que se acumula en los tejidos.

**-Coloraciones anormales internas:** pardeamiento de la pulpa en ananás (Paul y Rohrbach, 1985) y aguacate (Chaplin y Scott, 1980).

**-Senescencia acelerada:** pérdidas de clorofila y de la integridad celular a un ritmo más acelerado. En manzanas se conoce como "rotura senescente" (Dewey et al. (1985) y Saks et al. (1990)).

**-Incremento de la susceptibilidad a las infecciones** (frecuentemente micosis): no tiene lugar únicamente asociado a la decoloración del epicarpio, sino que consiste en una manifestación muy extendida de los daños por frío (McDonald, 1989; Paull, 1990). Los microorganismos que atacan con éxito a los frutos dañados son en muchas ocasiones parásitos débiles que no crecen sobre frutos sanos (*Alternaria* spp. en tomates, etc.).

**-Fracaso general de la maduración:** los frutos refrigerados antes de que hayan completado la maduración no lo consiguen durante ni tras la refrigeración o maduran de modo anómalo, disminuyendo su aroma y surgiendo olores y sabores anormales. En otras ocasiones, en lugar de un fracaso de la maduración se produce una aceleración del reblandecimiento de los frutos, como han observado Jackman et al. (1992) en tomates incubados a 22°C tras mantenerlos a temperaturas inferiores a la de seguridad.

Se han realizado una gran cantidad de estudios con el objetivo de diseñar procedimientos que permitan evitar o disminuir los daños por frío. Uno de ellos consiste en seleccionar los cultivares más

resistentes de la especie. Por otra parte, también es posible seleccionar zonas de cultivo donde el riesgo de heladas sea mínimo y, de este modo, evitar que los frutos sufran daños ya antes de su recolección. La exposición de la flor del tomate a temperaturas bajas puede ocasionar alteraciones que se manifiesten en el fruto (Elkind *et al.*, 1990; Barten y Scott, 1992), lo que obliga a tener en cuenta el régimen de temperaturas en un período más amplio del ciclo vegetativo de la planta.

También influyen en la tolerancia al frío el grado de madurez en el momento de la refrigeración (Chen y Paull, 1986), la duración de la refrigeración (Autio y Bramlage, 1986) y la época de recolección (Dodds *et al.*, 1991). Nakamura *et al.* (1985) han observado que la disminución del contenido en agua parece incrementar la resistencia de berenjenas y pepinos: los frutos recolectados inmediatamente después de una lluvia son menos resistentes. Un efecto similar se ha comprobado al comparar la tolerancia al frío de frutos desarrollados en suelo húmedo frente a aquellos desarrollados en suelo seco (Nakamura *et al.*, 1987). También la berenjena adquiere una mayor resistencia al frío si antes de la refrigeración se mantiene en una atmósfera seca que permita que pierda un 2 % de su peso (Nakamura *et al.*, 1986). El conocimiento de los hechos citados puede ayudar a diseñar estrategias de cultivo y recolección que permitan obtener frutos más resistentes a los daños por frío y que, por consiguiente, puedan ser refrigerados a temperaturas más bajas, lo que puede facilitar su comercialización.

Se conocen multitud de procedimientos de aplicación postcosecha puestos a punto para frutos específicos que permiten combatir la aparición de daños por frío. Uno de ellos es el acondicionamiento a temperaturas intermedias antes de su posterior conservación a temperaturas más bajas (Kramer y Wang, 1989; Hatton, 1990; Wang *et al.*, 1992). Otra estrategia es el calentamiento intermitente de la fruta de modo periódico antes de que tengan lugar cambios degenerativos (Lyons, 1973). También el tratamiento a altas temperaturas antes de iniciar la refrigeración ha sido efectivo en berenjena y pepino (Nakamura *et al.*, 1985), papaya (Chen y Paull, 1986), limón (McDonald *et al.*, 1989), melones (Risse *et al.*, 1990) y otros frutos. El calentamiento de cotiledones de pepino a 37-42°C indujo la síntesis de 5 proteínas ("heat shock proteins"), lo que podría explicar el incremento observado de la resistencia a los daños por frío (Lafuente *et al.*, 1991). En melones se ha mostrado eficaz otro procedimiento consistente en incubar los frutos con etileno antes de

la refrigeración (Lipton y Wang, 1987).

La causa principal de que aparezca el picado en los frutos parece ser un déficit de calcio en algunas zonas de los mismos debido a una distribución anormal de este nutriente. Esta alteración parece ser la consecuencia de un desequilibrio en la relación (K + Mg/Ca) y se puede prevenir antes de la recolección mediante la adopción de un plan de abonado adecuado o/y tras la recolección mediante un baño de los frutos en una disolución con cloruro cálcico, habiendo mostrado una mayor eficacia la infiltración a vacío de la sal cálcica (Durán, 1983a). La aplicación de este tratamiento a las peras ofrece la ventaja simultánea del retraso en algunos fenómenos de la maduración que produce el calcio (Delhom, 1986).

El escaldado parece ser que se debe a la acumulación de  $\alpha$ -farneseno, un hidrocarburo volátil, bajo la piel de los frutos. Su velocidad de síntesis continúa siendo notable a baja temperatura y se acumula en el epicarpio y en la zona de mesocarpio contigua, donde se sintetiza, dañando a estos tejidos (Jamieson, 1980; Durán, 1983c). El pardeamiento puede aparecer dentro de la cámara o después de la salida de ésta. Este pardeamiento no afecta al sabor ni a la textura del fruto, pero perjudica considerablemente a su aspecto y hace que pierda valor comercial. Para evitarlo se suele dar un baño a los frutos recién recolectados con alguna de las siguientes sustancias antioxidantes: etoxiquina, difenilamina, diterbutilmetilfenol (Hardenburg *et al.*, 1986; Durán, 1983c; Delhom, 1986), o bien palmitato de ascorbilo, hidroxitolueno butilado, galato de n-propilo o  $\alpha$ -tocoferol mezclados con coadyuvantes (Soria *et al.*, 1993). También se utilizan la etoxiquina y el benzoato sódico como captorees de radicales libres de oxígeno (Wang y Baker, 1979).

Existen otros procedimientos encaminados a combatir la aparición de los daños por frío, pero los citados son los de más amplio uso.

#### **II.4.3. METODOS DE CONSERVACION BASADOS EN LA RESTRICCIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE OXIGENO POR LOS FRUTOS.**

El efecto de retraso en la maduración que ejercen los distintos métodos de conservación está basado en la exposición de los frutos a atmósferas de composición diferente a la del aire con una baja pre-



sión parcial de  $O_2$  y/o alta de  $CO_2$ . Estas presiones parciales diferentes se pueden alcanzar mediante diversos procedimientos (Lipton, 1975; Kader, 1980):

- Utilización de generadores de atmósfera de composición controlada. Se usan para aplicar los métodos de atmósfera controlada (CA), denominándose de este modo a las técnicas de almacenamiento de frutos en los que la composición de la atmósfera del recinto de almacenamiento se ha modificado con respecto a la del aire: se eleva la concentración de  $CO_2$  y se disminuye la de  $O_2$ . Las concentraciones escogidas de estos gases se suelen controlar con una precisión que oscila entre el 0,1-1,0 %, dependiendo de la técnica utilizada.

- Restricción de la ventilación de los frutos, ya sea mediante su confinamiento en cámaras herméticas o parcialmente ventiladas, en cajas o en envoltorios individuales de permeabilidad reducida a los gases. Estos procedimientos se aplican en los métodos de atmósfera modificada (MA), que sólo se diferencian de los de CA en que en los primeros las concentraciones de  $CO_2$  y  $O_2$  no se controlan de modo estricto o no se controlan en absoluto. El  $CO_2$  normalmente procede de la respiración del propio fruto, disminuyendo simultáneamente la concentración de  $O_2$  de la atmósfera del contenedor, aunque también se ha utilizado hielo seco como forma de aportar  $CO_2$  a la atmósfera de la cámara.

- Recubrimiento de los frutos con una capa de cera semipermeable a gases. Este procedimiento es una variante de los métodos de MA.

- Paso por el contenedor de los frutos de un flujo de  $N_2$  para disminuir el nivel de  $O_2$ .

- Almacenamiento hipobárico.

#### II.4.3.1. CONSERVACION EN ATMOSFERA CONTROLADA.

El almacenamiento de un fruto en CA sólo está justificado si se satisface al menos una de las siguientes exigencias: debe tener mejor aspecto, mejor sabor, mejor textura, menor grado de envejecimiento o menores desórdenes fisiológicos que cuando se almacena en aire bajo las mismas condiciones de presión y temperatura que en CA. Este aumento de calidad puede alcanzarse sólo si la CA ralentiza la

maduración o el envejecimiento del fruto sin dañarlo (Lipton, 1975). En la puesta a punto de un método de CA éste debe demostrar que ejerce un efecto de retraso en la maduración del fruto y que realmente alarga la vida comercial del mismo mediante una evaluación de los parámetros de calidad más adecuados: aspecto, textura, sabor y valor nutricional (Kader, 1986).

Por otra parte, sólo en el caso de los frutos que continúan madurando tras su recolección puede esperarse que el empleo de la CA sea útil. Así las uvas o los frutos cítricos, que suelen ser recolectados plenamente maduros, no son candidatos para la conservación en CA si lo que se busca es retrasar su maduración (Lipton, 1975).

La conservación en CA suele aplicarse combinada con la refrigeración. De este modo se consiguen mayores tiempos de conservación con menores pérdidas de calidad.

El retraso en la maduración de los frutos mediante la aplicación de la CA por un corto período (de 1 a 4 semanas, dependiendo del fruto) generalmente no tiene efectos negativos sobre el sabor. Sin embargo, el almacenamiento prolongado (más de 4 semanas) bajo CA puede provocar pérdidas de calidad en el sabor tras la salida de los frutos de la CA y su posterior maduración. Una excepción a esta generalización son las manzanas y las peras, que pueden ser mantenidas en CA durante varios meses sin pérdidas apreciables de sabor ni calidad (Kader, 1980). También el kiwi soporta muy bien el almacenamiento prolongado bajo CA: una atmósfera con un 2 % de O<sub>2</sub> y un 5 % de CO<sub>2</sub> puede retrasar el reblandecimiento del fruto y la conversión de almidón en azúcares durante 6 meses a 0°C (Cotter *et al.*, 1991).

#### **-Niveles óptimos de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.**

La efectividad de la conservación en CA sobre el retraso en la maduración se ve afectada por el tipo de fruto, la variedad, el estado de desarrollo en el momento de la recolección, la temperatura, la duración de la conservación bajo CA, la composición en O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de la atmósfera de la cámara y la interacción de éstos con otros componentes de la atmósfera, tales como el C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.

Para conseguir un retraso en la maduración son necesarios niveles de O<sub>2</sub> inferiores al 8 % y/o de CO<sub>2</sub> superiores al 1 %. Cuanto más bajo sea el nivel de O<sub>2</sub> y más alto el de CO<sub>2</sub>, mayor será el

retraso producido en la maduración (Kader, 1980). Sin embargo, existen límites más allá de los cuales pueden ser más importantes los daños fisiológicos producidos en el fruto que los beneficios obtenidos del retraso en la maduración. Niveles de  $O_2$  inferiores al 3% pueden inhibir la glucólisis. En condiciones anaerobias los frutos producen acetaldehído y etanol, dos sustancias volátiles que incluso a bajas concentraciones incrementan los daños por frío y producen daños fisiológicos en los mismos (Jamieson, 1980). Kader y Morris (1977) puntualizaron que un 2 % de  $O_2$  es el límite inferior tolerado por la mayoría de los frutos. Por debajo de este nivel se desarrollan sabores y aromas extraños. También hay que tener en cuenta que los frutos expuestos a estos niveles de  $O_2$  pueden también perder su capacidad de madurar con uniformidad una vez que salen de la CA.

Por otra parte, Frenkel y Patterson (1977) observaron que las peras Bartlett sometidas a niveles elevados de  $CO_2$  cuando estaban desarrolladas pero inmaduras mostraron alteraciones de la ultraestructura de orgánulos tales como mitocondrias, plástidos y otros sistemas de membrana, así como en tonoplasto y plasmalema. Las alteraciones ultraestructurales sufridas en estos frutos sugieren que los niveles altos de  $CO_2$  inducen una destrucción incontrolada de los tejidos similar a la observada durante la senescencia (Brecht, 1980). El alto contenido en  $CO_2$  incrementa también el pH de las peras Bartlett, mientras que el bajo nivel de  $O_2$  no afecta a este parámetro (Ke y Kader, 1992). Por otra parte, los límites de tolerancia para los niveles elevados de  $CO_2$  varían mucho entre los distintos frutos y entre las diferentes variedades de un mismo fruto: la mayor parte de los frutos toleran niveles de  $CO_2$  de hasta un 5 % (plátano, kiwi, ciruela albaricoque, mango, naranja, etc.) pero otros sufren serios daños a esta concentración (peras, tomates, uvas). Sin embargo, las cerezas y las fresas no sólo toleran niveles del 10-20 % de  $CO_2$  sino que se ven beneficiados por la conservación en esas condiciones. Un buen índice de las diferencias de tolerancia frente a niveles elevados de  $CO_2$  son las condiciones recomendadas para su conservación en CA (Kader, 1980).

#### **-Eliminación del etileno en CA.**

Se ha demostrado experimentalmente que la extracción del etileno de las cámaras de atmósfera controlada prolonga el mantenimiento de la textura por parte de las manzanas, siempre y cuando sean recolectadas antes del inicio del climaterio, se inicie su conservación

bajo CA antes de éste y se mantenga prácticamente sin etileno la atmósfera de la cámara de conservación bajo CA (Forsyth et al., 1969; Knee et al., 1975; Liu, 1977).

La eliminación del etileno también permite obtener bajas intensidades respiratorias y una producción reducida de otras sustancias volátiles (etanol, acetaldehído, acetato de etilo) por parte de los frutos. El almacenamiento en atmósfera limpia de etileno ha demostrado ser útil, además, en la conservación de kiwi, aguacate y otros frutos.

#### **-Tratamientos previos con CO<sub>2</sub>.**

El tratamiento con CO<sub>2</sub> previo al almacenamiento bajo CA pueden potenciar las posibilidades de la CA. Couey y Olson (1977) recomendaron almacenar las manzanas de la variedad 'Golden Delicious' bajo 10-20 % de CO<sub>2</sub> durante 10-15 días inmediatamente después de la recolección y antes de ponerlas bajo CA. Los frutos sometidos a este tratamiento retuvieron mejor su textura y perdieron menos acidez, sufriendo escasos o nulos daños por CO<sub>2</sub>. Sin embargo, un tratamiento similar dado a otras variedades de manzana e incluso a la misma variedad 'Golden Delicious' de frutos procedentes de zonas distintas produjo muchos más daños por CO<sub>2</sub> que beneficios (Smock, 1979).

#### **-Efecto de la CA y el CO sobre las micosis.**

El empleo de la CA tiene un efecto indirecto sobre la prevención de enfermedades micóticas, dado que la CA retrasa la maduración y los frutos maduros son más sensibles que los inmaduros a este tipo de alteraciones (Kader, 1980). Además de esto, recientemente se ha descrito un efecto fungistático de la CA sobre B. cinerea durante la conservación de otros órganos vegetales, mejorándose esta acción mediante la adición de pequeñas cantidades de SO<sub>2</sub> (Hammer et al., 1992).

La adición de CO a la CA puede potenciar las posibilidades que ofrece este método. Burg y Burg (1969) informaron que el CO, el cual ejerce sus efectos biológicos enlazándose a metaloenzimas, puede reemplazar al etileno en todas sus funciones. Solomos y Laties (1973) informaron que un 0,1 % de CO en el aire causó un rápido inicio del climaterio respiratorio, de la producción de etileno y de

la maduración en plátanos y aguacates. Kader et al. (1977) obtuvieron unos resultados similares. A pesar de que se produce una aceleración de la maduración de los frutos en aire normal, existen informes que afirman que este efecto no se presenta bajo ciertas condiciones de CA: el CO al 5-10 % en aire incrementó la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> y etileno y la velocidad de maduración de tomates recolectados antes de que se iniciase su maduración Kader et al. (1978). Sin embargo, la velocidad de maduración de estos frutos mantenidos en CA con un 4 % de O<sub>2</sub> no se vio afectada por la presencia de CO. El estudio de los posibles beneficios netos del empleo del CO tiene interés por su demostrada efectividad en disminuir el grado de incidencia de podredumbres en los frutos cuando se aplica al 5-10 % durante el almacenamiento en CA (Woodruff, 1977; Kader et al., 1977; 1978; El-Goorani y Sommer, 1979). El CO en combinación con la CA es más efectivo en el control de las podredumbres infecciosas que cuando se aplica en aire normal. De este modo, la adición de un 5-10 % de CO puede ser un complemento útil a la conservación en CA de los frutos, pues reduce la incidencia y severidad de las podredumbres infecciosas sin ejercer efectos indeseables sobre la maduración (Kader, 1980).

#### **-Conservación bajo N<sub>2</sub>.**

La conservación bajo atmósfera de N<sub>2</sub> puro también se ha aplicado antes de someter a los frutos a la CA. Evans (1936) observó que las manzanas tratadas con 100 % N<sub>2</sub> a 4'4°C durante una semana antes de su almacenamiento en atmósfera normal se mantenían en buenas condiciones, buen sabor incluido, durante 7 meses. Las frambuesas almacenadas a 0°C en N<sub>2</sub> puro tendían a perder su sabor pero el resto de los parámetros de calidad permanecía inalterado (Evans, 1953). Las fresas almacenadas a 0°C y en N<sub>2</sub> puro se mantenían en buenas condiciones, mientras que los plátanos, tomates y melocotones verdes almacenados a temperaturas superiores sufrían daños. Esto indica que la respuesta a la atmósfera de N<sub>2</sub> puro es más segura a bajas temperaturas que a temperaturas más elevadas. La razón de estas diferencias parece ser que los frutos requieren más O<sub>2</sub> a altas temperaturas que a bajas temperaturas. El problema de los sabores anormales encontrados en otros trabajos no citados parece deberse a que la falta de O<sub>2</sub> produce una respiración anaerobia en el fruto (Farooqi, 1974).

#### II.4.3.2. CONSERVACION EN ATMOSFERA MODIFICADA MEDIANTE EL USO DE ENVOLTORIOS PLASTICOS.

Las bolsas de polietileno se utilizan para producir atmósferas modificadas de volumen reducido, que afectan a los frutos tratados de modo individual o en pequeños lotes (dependiendo del tamaño del fruto). Los frutos son envasados con aire atmosférico y su respiración hace que disminuya el contenido de  $O_2$  y aumente el de  $CO_2$ . El polietileno tiene una cierta permeabilidad a los gases, que depende de su naturaleza y grosor. Este parámetro junto con la superficie de la bolsa que contiene el fruto y la temperatura de almacenamiento van a determinar la composición de la atmósfera de la bolsa después de transcurrido algún tiempo tras el embalaje.

El almacenamiento de manzanas y peras en bolsas selladas de polietileno de baja densidad de 0'0015 pulgadas de grosor genera por sí mismo una atmósfera adecuada para la conservación de los frutos si se combina con la refrigeración. Sin embargo, al interrumpir la refrigeración de las bolsas y exponerlas a temperaturas de maduración, éstas deben perforarse para evitar daños causados por el alto contenido en  $CO_2$  y bajo en  $O_2$  de la AM a medida que la intensidad respiratoria de los frutos va aumentando con la temperatura (Farooqi, 1974). Los plátanos se conservan bien en bolsas de polietileno de 0'015 pulgadas de grosor durante 36 días, pero es necesario incluir en la bolsa un absorbente de etileno a base permanganato (Scott y Roberts, 1966; Scott *et al.*, 1970). Asimismo, Ben-Yoshua *et al.* (1981) y Casas (1983) ofrecen datos sobre el comportamiento positivo de frutos cítricos conservados envueltos en distintos tipos de películas plásticas, habiendo utilizado los primeros polietileno de alta densidad aplicado a frutos individuales mediante una máquina selladora diseñada específicamente para este fin (Nahir y Ben-Yoshua, 1977). También De la Plaza y Merodio (1987) han observado una conservación satisfactoria durante 13 días de fresones en cajas herméticas cerradas con una capa de polietileno y bajo refrigeración. El empleo de un absorbente de etileno contribuyó a retrasar la maduración de estos frutos.

También se han utilizado con fines comerciales los envoltorios plásticos con ventanas de difusión (Brecht, 1980).

Un material que recientemente ha demostrado su utilidad en la conservación de albaricoques (Pretel *et al.*, 1993) es el polipropileno microperforado, que permite escoger el grado de permeabilidad

al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> deseado.

#### II.4.3.3. CONTROL DE LA ATMOSFERA INTERNA DE LOS FRUTOS MEDIANTE RECUBRIMIENTOS CEREOS O SIMILARES.

La composición de la atmósfera interna del fruto puede ser alterada mediante su recubrimiento con una película de cera o un producto similar, pues se forma una barrera física que dificulta la difusión de los gases a través de los estomas del epicarpio, que son la principal vía de intercambio gaseoso de los tejidos del fruto con el exterior (Banks, 1984a). Tales recubrimientos, además de disminuir la velocidad del intercambio gaseoso del fruto con la atmósfera que los rodea, reducen las pérdidas de peso por evaporación de agua (Paull y Chen, 1989).

Estos recubrimientos retrasan la maduración de los frutos: en plátanos los bajos niveles tisulares de O<sub>2</sub> alcanzados reducen la respiración y la producción de etileno (Banks, 1984b), en mayor o menor medida dependiendo del grado de madurez del fruto en el momento de su recubrimiento (Banks, 1984c). Sin embargo, debido a la resistencia adicional a la difusión de gases aplicada artificialmente, el recubrimiento céreo puede producir daños al fruto cuando se lleva desde la baja temperatura de conservación a temperatura ambiente, pues la intensidad respiratoria es mayor a temperaturas superiores. Por otra parte, una capa de cera lo suficientemente delgada como para no producir daños a temperatura ambiente puede no tener ningún efecto beneficioso a baja temperatura. Por consiguiente, el grosor de tales recubrimientos debe ser ajustado a los requerimientos del fruto (Farooqi, 1974). Algunos autores han observado que el encerado de los frutos aumenta su resistencia a los daños por frío (Casas, 1983).

Además de los productos líquidos que contienen ceras en emulsión o disolución, existen otros preparados de aplicación similar tales como el Pro-Long, una disolución acuosa de ésteres de sacarosa y carboximetil celulosa sódica (Banks, 1984a) o las ceras de polietileno (Del Río *et al.*, 1993).

#### II.4.3.4 ALMACENAMIENTO HIPOBARICO.

El almacenamiento hipobárico consiste en mantener los frutos en un ambiente en el que la presión, humedad y temperatura se controlan de forma precisa. Además, la velocidad a la cual se renueva el aire de la cámara de almacenamiento también se controla. Cada uno de estos cuatro factores actúa de modo independiente y también en relación con los demás para crear un ambiente que en muchos casos es excelente para la conservación de frutos (Jamieson, 1980). Estos métodos ofrecen la oportunidad de conservar frutos para los cuales el parámetro más efectivo de un almacenamiento en CA es una baja concentración de O<sub>2</sub>. Estas técnicas permiten también un control más exacto de la disponibilidad de O<sub>2</sub> por el fruto.

La reducción de la presión atmosférica normal en el ambiente que rodea al fruto produce también una reducción en las presiones parciales efectivas (fugacidades) de los gases individuales presentes. Por ejemplo, una reducción de la presión a 1/5 de atmósfera produce una presión parcial de oxígeno equivalente a un 4 % de oxígeno en aire a presión normal.

Normalmente los gases producidos por el fruto (etileno, CO<sub>2</sub> y aromas volátiles) escapan a través de poros localizados en su superficie. La velocidad a la que estos gases se mueven depende de tres factores:

- a. La magnitud del gradiente de concentración: puede incrementarse eliminando los gases nocivos del ambiente de la cámara, ya sea renovándolo continuamente o ventilando de modo periódico. De este modo se pueden mantener concentraciones tisulares de etileno más bajas.
- b. La superficie de la sección de los poros: puede incrementarse elevando la humedad relativa en la cámara de almacenamiento. Se ha demostrado que el diámetro de poro en el epicarpio de las manzanas se dobla cuando la humedad relativa del ambiente de la cámara de almacenamiento se eleva desde 75 a 95 %.
- c. Movilidad de los gases: se refiere a la facilidad con que los gases se mueven a través del aire contenido en los poros. En un gas a baja presión hay relativamente pocas moléculas por unidad de volumen, luego cada molécula se mueve a una gran distancia antes de colisionar con otra. Hay, por consiguiente, una movilidad aumentada con respecto a la de los gases a presión atmosférica normal (Jamie-



son, 1980). Esta es la interpretación intuitiva de un fenómeno físico que se expresa matemáticamente como una proporcionalidad inversa entre el coeficiente de difusión de los gases y la presión de la atmósfera en la que se hallan. Como consecuencia, el etileno escapa del fruto con mayor rapidez que a presión atmosférica normal (Brecht, 1980; Kader, 1980).

#### II.4.4. TRAMPAS DE ETILENO.

Las técnicas de conservación de los frutos en atmósferas pobres en  $O_2$  frecuentemente se usan en combinación con métodos que permiten disminuir la concentración del etileno producido por los frutos en la atmósfera de la cámara.

Existen diferentes dispositivos utilizados como trampas de etileno, aunque la mayoría de ellos utilizan el permanganato de potasio como oxidante para transformarlo en etilén diol, el cual no afecta a los frutos (Pech *et al.*, 1982). En el almacenamiento en cámaras es frecuente el burbujeo del aire de la cámara bajo una disolución concentrada de  $KMnO_4$ . También se ha utilizado el  $KMnO_4$  en cristales (Scott *et al.*, 1968), mezclado con óxido de aluminio (Risse y Miller, 1983) u otros soportes porosos (vermiculita) impregnados de  $KMnO_4$  (De la Plaza y Merodio, 1987; Scott *et al.*, 1970). Pech *et al.* (1982) han descrito un preparado oxidante de etileno con tres componentes:  $KMnO_4$  para oxidar el etileno, un soporte que no absorbe agua y puede ser un soporte inerte (perlita) o un adsorbente de etileno (tierra de infusorios), y una sal higroscópica que mantiene la humedad del  $KMnO_4$ . Estos preparados pueden utilizarse tanto como filtros absorbentes en dispositivos de recirculación del aire de cámaras de conservación o envueltos en papel poroso e incluidos en envoltorios plásticos de frutos conservados en atmósfera modificada.

También puede extraerse el etileno de la atmósfera que rodea a los frutos mediante el empleo de diferentes tipos de adsorbentes: Streif (1978) ha utilizado filtros de carbón activado para extraer el etileno de cámaras de CA e Hirai (1982) ha descrito el empleo de un tamiz molecular de presentación granular sobre el cual se adsorbe el etileno.

#### II.4.5. INHIBIDORES DE LA BIOSINTESIS Y ACCION DEL ETILENO.

La mayoría de los frutos climatéricos son muy perecederos cuando la maduración está avanzada. Debido a esto, el desarrollo de un inhibidor reversible de la acción del etileno tendría un enorme valor. El inhibidor ideal sería aquel que no afectase al crecimiento y desarrollo del fruto, sino que simplemente detuviese la maduración y que sus efectos fuesen plenamente anulados mediante tratamiento con etileno (McGlasson, 1985). Algunos de los posibles modos de acción de este inhibidor ideal podrían ser:

1. Reducción de la sensibilidad del fruto a la acción del etileno generado por el Sistema 1. Existen buenas perspectivas para el desarrollo de un inhibidor de tales características, pues hay indicios de que existe de modo natural en algunos frutos antes de su separación de la planta: la bien conocida incapacidad de madurar del aguacate antes de su separación del árbol puede interpretarse en términos de sustancias anti-etileno. El ion  $Ag^+$  inhibe claramente la acción del etileno en varios tejidos vegetales (Beyer, 1981; Guinel y LaRue, 1992) y de hecho se utiliza para la conservación de flores (Halevy y Kofranek, 1977), aunque tiene varios inconvenientes: no puede ser aplicado a alimentos debido a su toxicidad; el etileno exógeno no invierte los efectos del ion  $Ag^+$  en tomate y plátano (Saltveit, 1980) y a concentraciones elevadas acelera la maduración en caqui (Takata, 1981).

2. Inhibición del Sistema 1 de producción de etileno. Se conocen al menos 3 tipos de sustancias de origen natural que inhiban la biosíntesis de etileno, pero sólo se ha encontrado uno de ellos en frutos: en papayas se han identificado glucosinolato de bencilo y trazas de su producto de hidrólisis isotiocianato de bencilo (Tang, 1971), un regulador de la producción de etileno en este fruto (Patil y Tang, 1974). En algunas plántulas se ha aislado una proteína que inhibe la producción de etileno inducida por auxinas (Sakai e Imaseki, 1973). El tercer grupo de sustancias lo constituyen distintos derivados de aminoácidos con grupos enol y éter que son sintetizados por algunos microorganismos. Los más conocidos de estos son la N-[2-(2-aminoetoxi)-etenil]glicina (AVG) y el ácido aminooxiacético (AOA), potentes inhibidores de la biosíntesis de etileno (Yang, 1981; Guinel y LaRue, 1992). Sin embargo, existen algunas dificultades que comprometen sus posibilidades de uso: penetración insuficiente en todos los tejidos del fruto; acceso del inhibidor a la ACC sintetasa y la

posibilidad de que el tejido tratado detoxifique al inhibidor o utilice una ruta alternativa que prescinda del enzima inhibido (McGlasson, 1985). Otros inhibidores de la síntesis de etileno son los agentes que neutralizan radicales libres, tales como n-propil galato, benzoato sódico, poliaminas, vitaminas K<sub>3</sub> y K<sub>5</sub> e ion cobalto (McGlasson, 1985). Recientemente el diazociclopentadieno activado por la luz ha demostrado ser también un inhibidor (Sisler y Blankenship, 1993).

3. Inhibición de un enzima o sistema enzimático clave en la maduración por medios químicos o mediante la inserción de un represor en la parte del genoma que controla la maduración. Esta posibilidad es hipotética porque no se ha identificado un enzima clave. Dos candidatos podrían ser la endopoligalacturonasa (en tomate) o la ACC sintasa, aunque existen algunas objeciones experimentales (McGlasson, 1985). Debe existir una señal precursora que induzca la síntesis de este último enzima.

#### II.4.6. IRRADIACION.

Los frutos climatéricos sometidos a irradiación gamma responden con un retraso de la maduración (Akamine y Moy, 1983; Urbain, 1986; Thomas, 1988) o un adelanto (Maxie *et al.*, 1966), dependiendo de la especie frutal y de su estado de desarrollo en el momento de aplicar el tratamiento. La diferencia en las respuestas observadas puede explicarse por doble efecto de la radiación gamma: 1) deterioro de las funciones celulares y por consiguiente de la maduración, aunque es posible una recuperación posterior (McGlasson y Lee, 1971; Romani *et al.*, 1968), y 2) estimulación de la síntesis de etileno (Abdel-Kader *et al.*, 1968; Larrigaudière *et al.*, 1991), del que se sabe que estimula la maduración (Brady, 1987; McGlasson, 1985).

#### II.4.7. PREVENCION DE INFECCIONES MICOTICAS.

Las micosis son más frecuentes en frutos sometidos a procedimientos de conservación que en los comercializados sin conservar. Esto se debe normalmente a que la elevada humedad relativa de las cámaras frigoríficas o de los envoltorios plásticos utilizados favorece el desarrollo de los hongos, aunque esto no siempre sucede (Lidster, 1990). Por otra parte, es frecuente que los frutos contaminados con esporas de hongos y no sometidos a conservación sean

consumidos antes de que se manifieste una fungosis. En frutos conservados, la refrigeración generalmente ralentiza el desarrollo de los hongos (Maude, 1980). Sin embargo, el mayor período de tiempo transcurrido tras la recolección incrementa la probabilidad de que se desarrollen infecciones fúngicas. También la mayor cantidad de manipulaciones a que se someten los frutos conservados favorece las micosis, lo que hace necesaria una manipulación cuidadosa de los frutos con el objetivo de evitar que se produzcan pequeños cortes y rozaduras en el epicarpio, pues son buenas vías de entrada de esporas (Durán, 1983f).

La utilización de fungicidas ha demostrado ser un procedimiento sumamente efectivo en la prevención de las micosis, siendo normalmente conveniente el tratamiento postcosecha a pesar de que se hayan utilizados fungicidas en el árbol. Son muchos los fungicidas comercializados, dependiendo su efectividad del tipo de fruto tratado y de las características de la zona de cultivo (que puede favorecer la contaminación con determinadas especies de hongos), además de otros factores ambientales. Entre los fungicidas de uso más frecuente se encuentran el Imazalil, Tiabendazol, Metalaxil, Folpet, Benomilo, Benlate y otros (Van Leemput *et al.*, 1986; Delhom, 1986; Durán, 1983f; McDonald, 1989; Shigeura y Bullock, 1976). El cloruro cálcico merece mención especial, pues además de ejercer efectos fisiológicos que favorecen la conservación de determinados frutos es frecuente su aplicación con el objetivo de combatir las micosis, ya sea de modo aislado o en combinación con otro fungicida (Delhom, 1986).

Los fungicidas suelen aplicarse en disolución o suspensión acuosa combinados con un agente surfactante que mejore el contacto del fungicida con el epicarpio del fruto (Delhom, 1986). El lavado de los frutos antes de su tratamiento es una medida aconsejable, pues permite el arrastre de una gran cantidad de esporas adheridas al epicarpio. La temperatura de la disolución fungicida suele estar comprendida entre 10 y 30°C, pues una temperatura más baja puede disminuir la efectividad del tratamiento, mientras que temperaturas más elevadas pueden dañar a los frutos. A pesar de esto, Couey y Hayes (1986) aplican a las papayas una doble inmersión en agua caliente seguida de una aplicación de Tiabendazol (Couey y Farias, 1979), persiguiendo un efecto no sólo fungicida, sino también insecticida.

Otro procedimiento de aplicación de fungicidas ha sido el descrito por Wells (1972) para el benomilo y la 2,6-dicloro-4-nitroani-

lina, consistente en emulsionarlos con cera que más tarde fue aplicada a melocotones y nectarinas.

Ya se han mencionado antes los efectos positivos sobre el control de las micosis que han demostrado determinados procedimientos de conservación en CA adicionada de SO<sub>2</sub> (Hammer *et al.*, 1990) o CO (Woodruff, 1977; Kader *et al.*, 1977; 1978; El Goorani y Sommer, 1979). También se han observado efectos beneficiosos de las atmósferas hipobáricas sobre el control de la infección por Botrytis cinerea (Barnes, 1968). En otros casos la incidencia de micosis ha sido severa bajo condiciones de CA (Baxter y Waters, 1990) o MA (Marangoni y Stanley, 1991; Vázquez-Ochoa y Colinas-León, 1990), por lo que no puede decirse que la conservación en condiciones de baja presión parcial de O<sub>2</sub> sea un método de aplicación general para su control.

La aplicación combinada de medidas higiénicas y tratamientos fungicidas ofrece resultados superiores a los que cada uno de estos procedimientos aislados permite (Delhom, 1986).

## **MATERIAL Y METODOS**

### III. MATERIAL Y METODOS.

#### III. 1. MATERIAL.

##### III.1.1. ESPECIE ENSAYADA.

Todos los experimentos se realizaron con frutos de chirimoyo (Annona cherimola Mill.) var. Fino de Jete. Su peso fue de  $300 \pm 50$  g de peso.

La temporada de recolección de los frutos utilizados se ha dividido en tres épocas, estableciendo la separación entre época temprana y media según la sensibilidad al frío de las chirimoyas, como se detalla en el capítulo de Resultados. El final de la época media lo marcan los últimos experimentos realizados en los que se observó una sensibilidad al frío comparable a la observada a su inicio. No se tienen datos que permitan afirmar que los frutos de la época tardía sean más sensibles al frío que los de la época media, pero hemos decidido diferenciarlos debido a que han terminado su desarrollo y se han recolectado en una época en la que la temperatura media se va elevando progresivamente. La época temprana se extiende desde mediados de septiembre hasta finales de octubre; la época media comprende los meses de noviembre a febrero; finalmente, la época tardía se extiende desde principios de marzo hasta mediados de mayo. Los frutos recolectados desde mediados de septiembre hasta la primera quincena de enero procedieron de la zona de Motril, mientras que los recolectados desde la mitad de enero hasta mediados de mayo procedieron de la zona de Jete.

Debe entenderse que los experimentos realizados se repitieron con frutos recolectados en las tres épocas procedentes de Motril y Jete salvo cuando explícitamente se diga lo contrario. También debe entenderse que los frutos recolectados en épocas y lugares diferentes se comportaron de modo similar, excepto cuando se diga lo contrario de modo explícito.

Los frutos se recolectaron siguiendo criterios de madurez fisiológica: después de que experimentasen un súbito crecimiento típico producido al final de su desarrollo en el árbol. Los frutos que

ya lo han experimentado se reconocen por:

-el engrosamiento rápido produce un estiramiento del epicarpio que se manifiesta en que el borde de separación entre carpelos se hace mucho menos prominente.

-el color verde del epicarpio pierde intensidad, adquiriendo un tono más claro.

La adopción de este criterio permitió seleccionar frutos que maduraron con normalidad y alcanzaron unas características organolépticas óptimas.

En ningún caso se muestran datos analíticos de frutos atacados por hongos, pues todos los frutos en los que se detectó su presencia fueron inmediatamente desechados para las catas y la determinación de parámetros fisiológicos y bioquímicos.

### III.1.2. APARATOS.

Las pesadas se realizaron en balanzas Mettler H20 T (peso máximo 160 g  $\pm$  0'01 mg), Cobos C-300 (peso máximo 300 g  $\pm$  0'01 g) y Cobos D-600 (peso máximo 600  $\pm$  0'1 g).

Para las medidas de pH se empleó un pHmetro Beckman Expandomatic SS-2. En las medidas de pH en mesocarpio de chirimoya se usó este pHmetro provisto de un electrodo de penetración Crison, de 4 mm de diámetro.

Las disoluciones se agitaron con vibradores Heidolph REAX 2000 y agitadores magnéticos P Selecta.

Para pipetear pequeños volúmenes de líquidos se utilizaron micropipetas tipo Hamilton.

Las incubaciones se efectuaron en baños termostatizados P Selecta y Precis-Term.

El homogeneizador utilizado en la preparación de extractos de tejidos fue un Sorvall (USA) Omnimixer con un vaso de 400 ml.

Se utilizaron termómetros de medida actual y de máxima y mínima de la casa Proton.



En las medidas de vacío se emplearon manómetros de columna de mercurio contruidos en este Departamento y posteriormente contrastados con un baratrón de la casa MKS Instruments Inc. (USA), modelo 170M-34C.

Las centrifugaciones se efectuaron en sendos aparatos Beckman, utilizándose el modelo J2-21 equipado con un rotor JA-20 para volúmenes de hasta 30 ml y el modelo Microfuge 11 con tubos Eppendorf para volúmenes menores de 1 ml.

Las determinaciones de etileno y etanol se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 300 equipado con un detector de ionización de llama y una columna de relleno Porapak Q.

Las determinaciones de sólidos solubles totales se realizaron con un refractómetro Shibuya (Japón) tipo High-contrast No. 121.

Las determinaciones de textura se realizaron con un texturómetro de aire comprimido construido en nuestro laboratorio.

Las medidas espectrofotométricas se llevaron a cabo en un aparato Beckman DU-70, con compartimento termostatzado. Se utilizaron cubetas TSL de 1 y 3 ml, en ambos casos de 1 cm de paso de luz.

En la observación de las características organolépticas de los frutos participó un panel de catadores de entre cinco y ocho personas.

### III.1.3. REACTIVOS.

En la preparación de tampones y como reactivos generales se utilizaron productos Merck (RFA) y Carlo Erba (Italia).

Los enzimas y sustratos procedieron de las firmas Boehringer-Mannheim (RFA) y Sigma Co. (USA). La firma Pennwalt (UK) suministró el detergente Deccosol C. La firma Fomesa (España) suministró el fungicida Imazalil y las ceras Waterwax y Melonwax. El etileno procedió de la firma Sociedad Española del Oxígeno, S. A.. Los fungicidas Tiabendazol, Ventine MZ, Ridomil MZ 72 y Ridomil Combi 50 los suministró Ciba-Geigy, mientras que el Fibenzol y el generador de etileno Ethrel fueron suministrados por ICI Zeltia.

### III.2. METODOS.

#### III.2.1. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES DE LOS FRUTOS.

##### III.2.1.1. LAVADO DE LOS FRUTOS.

En todos los experimentos los frutos se lavaron con Deccosol C al 0'2 % (v/v) a su llegada al laboratorio. Esto se hacía agitándolos en un baño de agua a 16-20°C que era renovada con frecuencia. Después se les escurría el agua y se dejaban secar a la temperatura del laboratorio durante 30-40 minutos o bien eran tratados inmediatamente con Imazalil.

El detergente Deccosol C se ha utilizado como agente mojante (Delhom, 1986) que permite el contacto con el fruto de los agentes activos aplicados más adelante. Es necesario emplear un mojante debido a la capa cerosa que recubre el epicarpio de las chirimoyas.

##### III.2.1.2. TRATAMIENTO CON FUNGICIDAS.

###### -Tratamiento con Imazalil.

Los frutos recién lavados se sumergieron en un baño de agua a 16-20°C adicionado de Deccosol C al 0'2 % (v/v) e Imazalil 0'05 % (p/v) (0'71 g del preparado comercial con un 70 % de riqueza en cada litro de disolución).

En el baño se agitaron durante 1 minuto, tras lo cual se les escurrió el agua y se dejaron a secar a la temperatura del laboratorio durante 30-40 minutos.

Este tratamiento se aplicó de modo rutinario a todos los frutos llegados al laboratorio, salvo cuando se especifique lo contrario.

**-Tratamiento con otros fungicidas.**

Los tratamientos con otros preparados fungicidas distintos del Imazalil (IV.1.3) se realizaron de modo similar al descrito antes para el Imazalil, sustituyendo éste por la dosis adecuada del fungicida de que se trate.

**III.2.1.3. TRATAMIENTOS TERMICOS.**

Los distintos tratamientos frigoríficos se llevaron a cabo en cámaras dotadas de termostato regulado a  $\pm 0'5^{\circ}\text{C}$ . Los tratamientos a temperaturas de  $20$  y  $23^{\circ}\text{C}$  se realizaron en cámaras con calefactor conectado a un termostato regulado a  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Para comprobar que las oscilaciones de la temperatura se mantenían dentro de los márgenes prefijados se utilizaron termómetros de máxima y mínima.

Para evitar diferencias significativas de temperatura en distintos puntos de una misma cámara se recurrió a la circulación de aire mediante convección forzada. La disposición de los frutos también permitió la circulación fluida del aire entre ellos. Varios termómetros situados junto a los frutos en diferentes zonas de la cámara informaron sobre su homogeneidad térmica.

La humedad relativa de las cámaras se mantuvo en niveles elevados poniendo recipientes con agua frente a la corriente de aire creada por el ventilador de cada cámara. Se midieron con un higrómetro las oscilaciones de la humedad relativa del aire, que fueron de un  $\pm 10\%$  en torno al valor central para temperaturas superiores a  $18^{\circ}\text{C}$ , y de un  $\pm 5\%$  para temperaturas inferiores a  $14^{\circ}\text{C}$ .

**-Preenfriamiento rápido.**

Con el objeto de enfriar rápidamente los frutos desde la temperatura ambiente inicial hasta  $12^{\circ}\text{C}$ , se introdujeron en una cámara a  $1^{\circ}\text{C}$ . Simultáneamente a un fruto testigo de peso similar al resto y forma regular se le introdujo un termómetro de modo que el bulbo de mercurio se situase en su centro. Cuando la temperatura del testigo alcanzó los  $12^{\circ}\text{C}$ , los frutos fueron trasladados a la cámara de  $12^{\circ}\text{C}$ .

**-Curvas de inercia térmica.**

Se realizaron incubando los frutos a 23°C hasta que su temperatura se estabilizó. Después se refrigeraron los frutos a 12°C y a 1°C. La temperatura en el centro de cada fruto se midió como se ha descrito en el preenfriamiento rápido. Para medir la temperatura a 2 cm bajo la superficie externa del fruto se situó el bulbo del termómetro en esa localización.

**III.2.1.4. TRATAMIENTOS HIPOBARICOS.**

En este tratamiento los frutos se introdujeron en campanas de vidrio de 20 litros con cierre hermético conectadas a una bomba de vacío y un vacuómetro. Se tomaron lecturas diarias de la presión y, en caso necesario, se efectuó su ajuste.

Tanto en la transición desde presión atmosférica a condición hipobárica como en el proceso inverso se procedió de forma lenta y escalonada para evitar daños en los frutos.

**III.2.1.5. CONSERVACION EN ATMOSFERA HIPOXICA AUTOGENE-RADA.**

**-Recubrimiento con ceras.**

Una vez lavados y secos, los frutos fueron bañados en el preparado céreo objeto de estudio, tras lo cual se dejaron secar a temperatura ambiente. Se han ensayado los dos preparados comerciales de la casa Fomesa que se describen a continuación:

-Waterwax:	Ceras sintéticas .....	11 %
	Goma laca .....	5 %
	Coadyuvantes y agua .....	84 %
-Melonwax:	Resina de hidrocarburos .....	15 %
	Hidrocarburos derivados del petróleo .....	65 %
	Metil-etil-cetona .....	20 %

**-Recubrimiento con películas plásticas.**

Se han estudiado los siguientes envoltorios plásticos:

a) Bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD) de 20  $\mu\text{m}$  de grosor. Las bolsas se cerraron anudando su extremo.

b) Película de PEBD de 3  $\mu\text{m}$  de grosor. Los envoltorios se cerraron aprovechando su carácter adhesivo.

A menos que se indique expresamente lo contrario, debe entenderse que el cierre de los envoltorios se realizó de modo que la cámara de aire resultante fuese lo menor posible.

**-Conservación en frascos herméticos de vidrio.**

Los frutos se introdujeron en envases de vidrio de 650 ml de capacidad provistos de cierre hermético.

**III.2.1.6. INCUBACION CON ETILENO.**

Se determinó el volumen de los frutos mediante inmersión en agua y medida del volumen desplazado. Una vez secos se introdujeron en campanas de vidrio de 20 litros con cierre hermético. A través de un septum de caucho y con una jeringa de insulina se introdujo en la campana el volumen de etileno necesario para que su atmósfera alcanzase la concentración deseada. La mezcla gaseosa se agitó invirtiendo suave y repetidamente la campana con los frutos dentro.

**III.2.1.7. TRATAMIENTO CON ACIDO CLOROETILFOSFONICO (ETHREL).**

Los frutos se trataron con una disolución de Deccosol C 0'2 % adicionada con Ethephon (Ethrel 48 %) hasta 1.500 ppm. durante 5 minutos, tras lo cual se dejaron secar a temperatura ambiente.

### III.2.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION TISULAR Y PRODUCCION DE ETILENO.

#### -Concentración de etileno tisular: preparación de la muestra.

Se trabajó con una porción de cada fruto con objeto de determinar otros parámetros en el mismo. La extracción de la muestra gaseosa se hizo inmediatamente para evitar el previsible aumento en la biosíntesis de etileno como reacción al trauma (McGlasson y Pratt, 1964; Hoffman y Yang, 1982) y que éste no se iniciase antes de finalizada la extracción.

En la preparación de la muestra se ha seguido la técnica de Beyer y Morgan (1970). De cada fruto se cortó con un cuchillo bien afilado una porción longitudinal (1/4 o 1/5). Se sumergió inmediatamente después en una disolución de Tween 80 al 0'01 % (agente mojan-te). La porción sumergida se agitó con objeto de que no quedase adherida ninguna burbuja de aire, pues podría diluir la muestra.

A continuación se sumergió la porción del fruto en una campana de vidrio parcialmente llena de una disolución acuosa saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  previamente desgaseada a vacío. La porción se puso bajo un embudo invertido con un septum de caucho en la punta. Se operó sin que quedase ninguna burbuja de aire dentro que pudiese diluir los gases desprendidos por el fruto. La campana se cerró herméticamente y se conectó a una toma de vacío con un regulador y un vacuómetro. Se hizo vacío para que bajase la presión rápidamente hasta 100 mm Hg, manteniéndose a este valor durante 1 minuto. Los gases desprendidos abundantemente por los tejidos quedaron recogidos por el embudo invertido. Después se abrió la entrada de aire de la campana para retornar rápidamente a la presión atmosférica. Se tomaron 3 muestras de 1 ml de los gases desprendidos a través del septum con una jeringa de insulina, cerrándose su extremo con un trocito de caucho. Estas muestras se inyectaron inmediatamente en el cromatógrafo de gases.

Hay que puntualizar que la concentración de etileno de estas muestras no es exactamente la concentración de etileno tisular, aunque así se mencione en adelante para simplificar, sino la concentración de etileno en el gas resultante de la mezcla de la fase gaseosa del fruto (espacios huecos en el interior del fruto) con los

gases disueltos en los tejidos y ahora desprendidos al hacer vacío.

**-Producción de etileno: preparación de la muestra.**

Los frutos se mantuvieron en las condiciones ambientales elegidas y periódicamente se realizó su traslado a un frasco de vidrio de 650 cc para la determinación de su velocidad de producción de etileno. El frasco estaba provisto de cierre hermético y un septum de caucho para toma de muestras. Mediante la medida previa del volumen del fruto (por inmersión en agua contenida en vaso graduado) se calculó el volumen de la cámara de aire del frasco con el fruto en su interior, dato necesario para los cálculos.

Tras la introducción del fruto en el frasco, se tomaron muestras de 1 cc de la atmósfera interna del fruto cada 2 minutos con una jeringa y se inyectaron inmediatamente en el cromatógrafo de gases. El volumen de cada muestra extraída (1 cc) era repuesto como aire fresco en el frasco para evitar una disminución de la presión, y la dilución consecuente fue obviada multiplicando cada medida por el factor de dilución correspondiente. Se realizaron entre 5 y 10 medidas consecutivas de este tipo para cada punto de la curva de velocidad de producción de etileno, observándose que la concentración de etileno en la atmósfera del frasco crecía con el tiempo de modo lineal en las primeras medidas, pero más adelante su ritmo de incremento disminuyó progresivamente. Esto es un artefacto debido a que la acumulación de etileno en la atmósfera del frasco disminuyó el gradiente de concentración de etileno entre los tejidos y la atmósfera, produciéndose una acumulación cada vez mayor en los tejidos del fruto del etileno producido, que al no salir a la atmósfera no fue medido. Por consiguiente, para obtener valores medios sólo se tuvieron en cuenta las medidas realizadas en la zona lineal del incremento de concentración de etileno, realizadas en los primeros minutos tras la introducción del fruto en el frasco.

Los cálculos se hicieron del modo siguiente:

$$P = \frac{C \cdot V}{p \cdot t}$$

siendo:

P: producción de etileno en  $\mu\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

C: concentración de etileno en la atmósfera del frasco, en  $\mu\text{l}/\text{l}$ .

V: volumen de aire en el frasco tras introducir el fruto, en l.

p: peso del fruto en kg.

t: tiempo de incubación del fruto en el frasco, en horas.

#### **-Técnica analítica cromatográfica.**

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases provisto de una columna de Porapak Q. La temperatura de trabajo fue de  $75^{\circ}\text{C}$ . Se usó  $\text{N}_2$  como fase móvil a un flujo de 20 ml/min. La respuesta del detector de ionización de llama (FID) usado (Englmaier, 1984) fue lineal entre 0'01 y 200  $\mu\text{l}/\text{l}$ .

El FID se calibró con patrones que se prepararon mediante dilución de 5 ml de etileno en aire a presión atmosférica, en botellas de vidrio de aproximadamente 1 l cuya capacidad se midió con un error de  $\pm 0'5$  ml. Las botellas estaban provistas de tapones de cierre hermético con septum de caucho incorporado a través del cual se realizaron las extracciones. Las botellas se conservaron invertidas y con el tapón y el cuello sumergidos en una disolución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para asegurar su estanqueidad. Los patrones preparados a partir de etileno puro se emplearon para efectuar una segunda dilución y obtener los patrones finalmente usados.

Se usó el método de normalización de área para calibrar el FID. Los cálculos se hicieron del modo siguiente:

$$\text{CE} = \text{S} / \text{UA}$$

siendo:

CE: concentración de etileno en  $\mu\text{l}$  etileno/l muestra,

S: superficie del pico de etileno en unidades de área, y

UA: respuesta del FID en unidades de área/ $\mu\text{l}$  etileno.



### III.2.3. DETERMINACION DE ETANOL EN MESOCARPIO.

El mesocarpio de una sección longitudinal de cada chirimoya se cortó en trozos pequeños que se mezclaron convenientemente. Se pesaron 4 g de tejido de cada fruto, reuniéndose 24 g de tejido (4 g de cada uno de los 6 frutos) de frutos sometidos a las mismas condiciones experimentales. El tejido se introdujo en el vaso de 400 ml del homogeneizador Sorvall y se le agregaron 240 ml de tampón de extracción (10 ml/g tejido).

Como tampón de extracción se utilizó tampón fosfato sódico 0'1 M, pH 6'7 y Tritón X-100 1 %.

La homogeneización se realizó con el aparato en fuerza 7 durante 5 minutos, manteniéndose sumergido en baño de hielo. Una porción del homogenado (unos 15 ml) se centrifugó a 25.000 x g durante 5 minutos y en el sobrenadante se determinó la concentración de etanol.

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases provisto de una columna de Porapak Q. La temperatura de trabajo fue de 90°C. Se usó N<sub>2</sub> como fase móvil a un flujo de 40 ml/min. El volumen de muestra fue de 9 µl, inyectados con una microjeringa de 10 µl. La respuesta del FID fue lineal entre 2'37 x 10<sup>-3</sup> ng y 2'37 ng (3 nl) de etanol. Las muestras se analizaron por sextuplicado.

El FID se calibró con disoluciones patrón de etanol de distinta concentración. Se usó el método de normalización de área.

Los cálculos se hicieron del modo siguiente:

$$EUV = S / (UA \times 0'009 \text{ ml})$$

$$CE = EUV \times 10 \text{ (ml/g tejido)}$$

siendo:

EUV: etanol por unidad de volumen de muestra, en ng/ml,  
 S: superficie del pico de etanol en unidades de área,  
 UA: respuesta del detector en unidades de área por nanogramo de etanol patrón inyectado,  
 V: volumen de extracto pinchado, y  
 CE: concentración de etanol en ng por gramo de tejido.

#### III.2.4. DETERMINACION DE SOLIDOS SOLUBLES TOTALES (SST) Y pH EN MESOCARPIO.

A cada fruto a analizar se le hizo un corte longitudinal. Inmediatamente después se comenzó a rascar el mesocarpio, en el ecuador del fruto, con la punta de un cuchillo para formar una papilla que se introdujo rápidamente en un tubo Eppendorf de 1'5 ml hasta llenar 2/3 de su capacidad. Fue fundamental operar rápido, pues la desecación del tejido habría elevado artificialmente el valor de SST. De cada fruto se tomaron tres muestras de cortes no adyacentes. Una vez preparadas las muestras, se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 minutos.

Los tubos Eppendorf se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 10 minutos después de la centrifugación, evitando que el sedimento se resuspendiese y se enturbiara el sobrenadante.

El refractómetro se calibró con una gota de agua destilada a temperatura ambiente. Después, una gota del sobrenadante de la papilla de mesocarpio se depositó sobre el prisma del refractómetro. Se leyó el índice de refracción expresado en grados Brix. Para hacer la conversión de la lectura desde la temperatura del laboratorio a 20°C se interpoló entre valores tabulados.

La medida del pH se realizó en la papilla de mesocarpio que quedó en el tubo Eppendorf tras la determinación de los SST. El volumen de muestra estuvo en torno a 0'5-0'7 ml. Para hacer la determinación se empleó un electrodo de penetración de tamaño reducido.

#### III.2.5. DETERMINACION DE TEXTURA EN MESOCARPIO.

De cada fruto se tomó una mitad cortada en sentido longitudinal. La mitad cortada se apoyó en la mesa por la superficie del corte. Se le hizo otro corte paralelo al primero y en la parte opuesta del fruto para dejar al descubierto una superficie de mesocarpio lo suficientemente amplia como para permitir tres determinaciones. Sobre este corte se apoyó el disco del penetrómetro.

Se usó un penetrómetro de aire comprimido y un juego de tres discos aplicables a su émbolo:

Disco 1: 4'91 cm<sup>2</sup>

Disco 2: 0'95 cm<sup>2</sup>

Disco 3: 0'42 cm<sup>2</sup>

En primer lugar se colocó el disco 1 en el émbolo del penetrómetro. Se abrió la llave del aire y, cuando entró en contacto el disco con el mesocarpio, se fue aumentando la presión lentamente. Al observar que el disco perforaba el mesocarpio se tomó lectura de la presión de aire en el émbolo. En los casos en que la presión de aire en el émbolo alcanzó los 5 bar sin que se rompiera el mesocarpio se cambió el disco 1 por el 2. Cuando esto volvió a suceder, se cambió el 2 por el 3.

Todas las medidas de textura para cada condición experimental se refirieron al valor que ofreció un grupo representativo de frutos a su llegada al laboratorio, considerado como índice 100. Para ello se hizo el cálculo siguiente:

$$\text{Textura} = (P \times S_0 \times 100) / (P_0 \times S)$$

siendo:

P: presión de ruptura del fruto analizado,

P<sub>0</sub>: presión de ruptura de los frutos de referencia recién llegados al laboratorio,

S<sub>0</sub>: superficie del disco usado al determinar P<sub>0</sub>,

S: superficie del disco usado al determinar P.

### III.2.6. DETERMINACIONES DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN MESOCARPIO.

La determinación de cada actividad enzimática se realizó sobre extractos de mesocarpio preparados de modo específico para cada enzima. Sin embargo, los extractos se diferenciaron sólo en el tampón de extracción utilizado para cada enzima y en que la muestra de tejido fuese fresca o descongelada. El resto del protocolo, que se describe a continuación, es idéntico.

De cada fruto se tomó una sección longitudinal y se separó el epicarpio y semillas con ayuda de cuchillo y espátula. Una vez cortado el mesocarpio en trozos pequeños, se mezclaron bien y se continuó con la preparación del extracto o bien se congeló el tejido, según qué enzima se pretendiese determinar. Se introdujeron 5 gramos de tejido (fresco o bien recién descongelado) en el vaso de 400 ml del homogeneizador. Se agregaron 2'5 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) como adsorbente de fenoles (Loomis, 1974) y 50 ml del tampón de extracción específico previamente enfriado a 0-4°C. La homogeneización se realizó con el aparato a fuerza 7 durante 5 minutos, manteniendo el vaso semisumergido en baño de hielo. Una porción del homogenado (unos 15 ml) se centrifugó a 25.000 x g durante 5 minutos y 2°C. El sobrenadante obtenido fue la muestra a analizar.

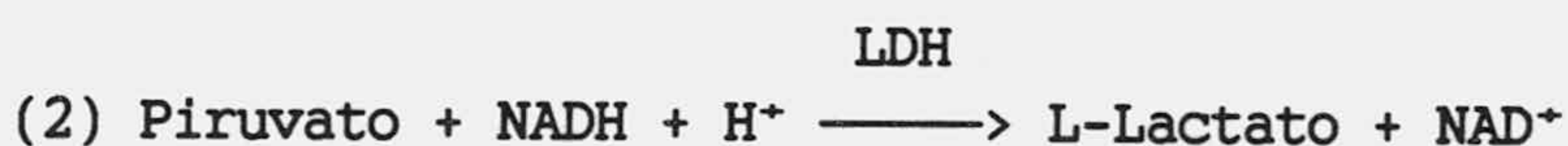
Para cada actividad enzimática se realizó un estudio de su estabilidad en el tejido frente a dos formas de congelación (lenta en congelador a -25°C o rápida bajo N<sub>2</sub> líquido) seguidas de conservación a -25°C. Cada estudio se realizó en 5 frutos de forma independiente en cada uno de ellos. De cada fruto se tomó una porción de mesocarpio de unos 30 g de peso. El tejido fue cortado en trozos pequeños y, después de mezclarlos, se dividió en 3 porciones de aproximadamente 10 g. Una porción se empleó inmediatamente para obtener un extracto enzimático y las otras dos fueron congeladas: una de ellas lentamente en arcón congelador a -25°C y la otra rápidamente en N<sub>2</sub> líquido, siendo conservadas ambas a -25°C tras la congelación. Tres meses después el tejido se dejó descongelar a temperatura ambiente e inmediatamente se prepararon extractos enzimáticos.

Se determinó actividad enzimática en cada extracto de los mencionados inmediatamente tras su preparación. Los valores de actividad en los extractos de tejido congelado se compararon con los valores de tejido fresco y se hallaron los porcentajes medios de actividad remanente para los 5 frutos. Con estos datos se decidió si la actividad se determinaría en extractos de tejido fresco, congelado a -25°C o en N<sub>2</sub> líquido.

Para conocer la estabilidad de cada enzima en su extracto específico se prepararon 5 extractos a partir de tejido conservado del modo escogido para ese enzima. Se realizaron determinaciones de actividad enzimática en los extractos refrigerados a intervalos de tiempo crecientes y se calcularon los valores medios de los porcentajes de actividad remanente.

### III.2.6.1. ALANINA AMINOTRANSFERASA.

La determinación se realizó siguiendo una modificación del método descrito por Bergmeyer y Bernt (1974a). Su fundamento es el siguiente:



El equilibrio de la reacción (2) está desplazado hacia la derecha. El piruvato formado en la reacción (1) es, por tanto, rápidamente transformado en L-lactato. La actividad alanina aminotransferasa se determinó midiendo la velocidad de oxidación del NADH en la reacción (2).

Como medio de extracción se empleó tampón fosfato potásico 80 mM, pH 7'4 con Tritón X-100 1 %.

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un medio constituido por tampón fosfato potásico 80 mM, pH 7'4, L-Ala 800 mM, NADHNa<sub>2</sub> 0'18 mM, α-CGK<sub>2</sub> 18 mM, LDH 5'5 U/ml, tampón de extracción y muestra.

A cada cubeta se le agregaron 0,85 ml que contenían el tampón fosfato, L-Ala, NADH y LDH necesarios para 1 ml de medio. Después se incubó durante 3 minutos a 25°C (temperatura de reacción) y se le añadieron 0,040 ml de tampón de extracción y 0'010 ml de muestra. La reacción se inició agregando 0'1 ml de α-CG 180 mM. Se leyó la disminución de absorbancia a 340 nm por minuto entre los minutos 0 y 3. Cada muestra se analizó por triplicado. A cada lectura se le restó el valor dado por un blanco preparado de igual modo pero sustituyendo el α-CG por igual volumen de agua destilada.

Los cálculos se realizaron de acuerdo con la expresión siguiente:

$$(3) \quad A = (\Delta m - \Delta b) \times \frac{V_c}{V_m} \times \frac{1}{\epsilon \times 1 \text{ cm}} \times \frac{10 \text{ ml extracto}}{\text{g tejido}}$$

siendo:

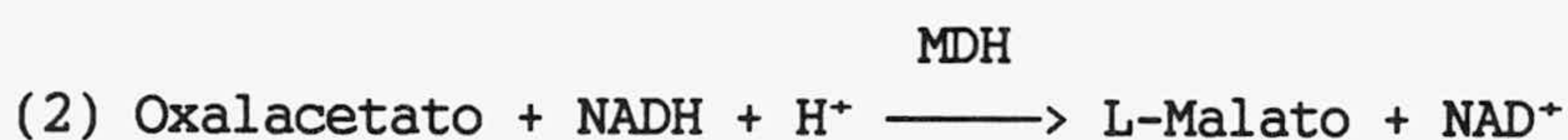
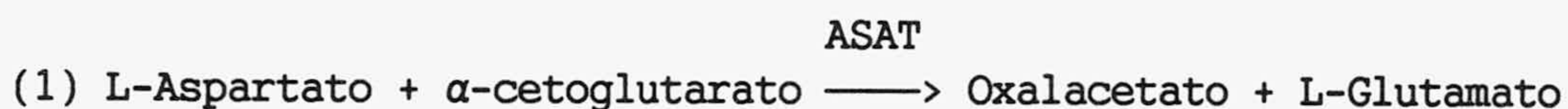
- A: actividad alanina aminotransferasa en  $\mu\text{mol (L-Ala) x min}^{-1} \text{ x g}^{-1}$  de tejido,  
 Am: velocidad de disminución de absorbancia producida por la muestra en unidades de absorbancia  $\text{x min}^{-1}$ ,  
 Ab: velocidad de disminución de absorbancia producida por el blanco en unidades de absorbancia  $\text{x min}^{-1}$ ,  
 Vc: volumen de reacción en cubeta (1 ml)  
 Vm: volumen de muestra en cubeta (0'010 ml), y  
 $\epsilon$ : (coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm) =  
 =  $6'22 \text{ cm}^2 \text{ x } \mu\text{mol}^{-1}$

Los extractos preparados con tejido congelado en  $\text{N}_2$  líquido o en congelador a  $-25^\circ\text{C}$  sólo presentaron entre 1/3 y 1/4 de la actividad de los extractos preparados con tejido fresco. Por este motivo todas las determinaciones de actividad se hicieron en tejido fresco.

Los extractos de tejido fresco perdían un 6 % de su actividad a  $4^\circ\text{C}$  cada 24 horas. El piridoxal fosfato a concentraciones de 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  en los extractos no ejerció un efecto estabilizador de la actividad. Por consiguiente, las determinaciones de actividad alanina aminotransferasa se realizaron en extractos de tejido fresco sin adición de piridoxal fosfato y en las 2 horas siguientes a su preparación.

### III.2.6.2. ASPARTATO AMINOTRANSFERASA.

La determinación de aspartato aminotransferasa (E.C.2.6.1.1.) se realizó siguiendo una modificación del método descrito por Bergmeyer y Bernt (1974b). Su fundamento es el siguiente:



El equilibrio de la reacción (2) está desplazado hacia la derecha. El oxalacetato formado en la reacción (1) es, por tanto, rápidamente transformado en L-malato. La actividad ASAT se determinó

midiendo la velocidad de oxidación del NADH en la reacción (2).

Como medio de extracción se utilizó tampón fosfato potásico 80 mM, pH 7'4, Tritón X-100 1 %.

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un medio constituido por tampón fosfato potásico 80 mM, pH 7'4, L-Asp 200mM, NADHNa<sub>2</sub> 0'18 mM,  $\alpha$ -CGK<sub>2</sub> 12 mM, MDH 6 U/ml, LDH 5'5 U/ml, tampón de extracción y muestra.

A cada cubeta se le agregaron 0'85 ml que contenían el tampón fosfato, L-Asp, NADH, LDH y MDH necesarios para 1 ml de medio. Después se incubó durante 3 minutos a 25°C (temperatura de reacción) y se le agregaron 0'042 ml de tampón de extracción y 0'008 ml de muestra, incubando a continuación durante 5 minutos. La reacción se inició agregando 0'1 ml de  $\alpha$ -CG 120 mM. Se leyó la disminución de absorbancia a 340 nm por minuto entre los minutos 0 y 3. Cada muestra se analizó por triplicado. A cada lectura se le restó el valor dado por un blanco preparado de igual modo pero sustituyendo el  $\alpha$ -CG por igual volumen de agua destilada.

Los cálculos se realizaron de acuerdo con la expresión (3) de la sección III.2.6.2., siendo en este caso:

A: actividad ASAT en  $\mu\text{mol (L-Asp) } \times \text{ min}^{-1} \times \text{ g}^{-1}$  de tejido, y  
Vm: volumen de muestra en cubeta (0'008 ml).

Los extractos preparados con tejido congelado en N<sub>2</sub> líquido o en congelador a -25°C conservaron un 65 a 90 % de la actividad del extracto preparado con tejido fresco. Por este motivo todas las determinaciones de actividad se hicieron en fresco.

Los extractos de tejido fresco perdieron un  $1'6 \pm 2'45$  % de su actividad a 4°C cada 24 horas. Tampoco el piridoxal fosfato los estabilizó. Por consiguiente, se utilizaron extractos de tejido no congelado sin adición de piridoxal fosfato y se determinó actividad ASAT en las 4 horas siguientes a su preparación.

### III.2.6.3. 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA.

La determinación de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.44.) se realizó siguiendo una modificación del método descrito por King (1974). Su fundamento es el siguiente:



La determinación de la actividad enzimática se basó en la medición espectrofotométrica de la velocidad de formación de NADPH.

Como medio de extracción se utilizó tampón trietanolamina·HCl 66'7 mM, pH 7'5 (NaOH) y Tritón X-100 1 %.

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un medio constituido por tampón trietanolamina·HCl 50 mM, pH 7'5 (NaOH) NADPNa<sub>2</sub> 1 mM, 6-PG 1 mM, EDTANa<sub>4</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y muestra.

A cada cubeta se le agregaron: 0'15 ml que contenían el NADP, MgCl<sub>2</sub> y EDTA necesarios para 1 ml de medio; 0'72 ml de tampón trietanolamina·HCl 66'7 mM, pH 7'5 (NaOH), y 0'030 ml de muestra. Después se incubó durante 3 minutos a 25°C (temperatura de reacción). La reacción se inició agregando 0'1 ml de 6-PG 10 mM. Se esperó el tiempo necesario para que la absorbancia experimentase un incremento de 0'020 y después se midió la variación de absorbancia por minuto durante 8 minutos. Se comprobó la linealidad de la reacción. Cada muestra se analizó por triplicado.

Se preparó un blanco de igual modo pero sustituyendo el 6-PG 10 mM por igual volumen de agua destilada. La lectura del blanco se tomó en el mismo intervalo de tiempo que la de la muestra, contando a partir del inicio de la reacción.

Los cálculos se realizaron de acuerdo con la expresión (3) de la sección III.2.6.2., siendo en este caso:

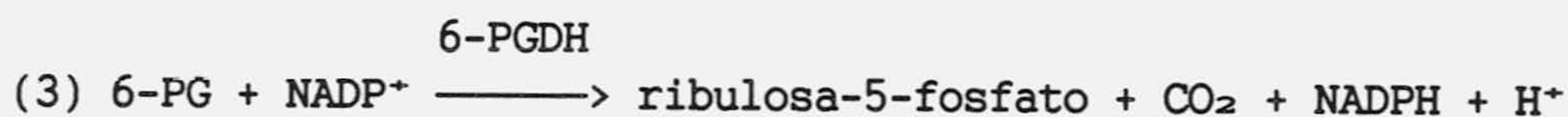
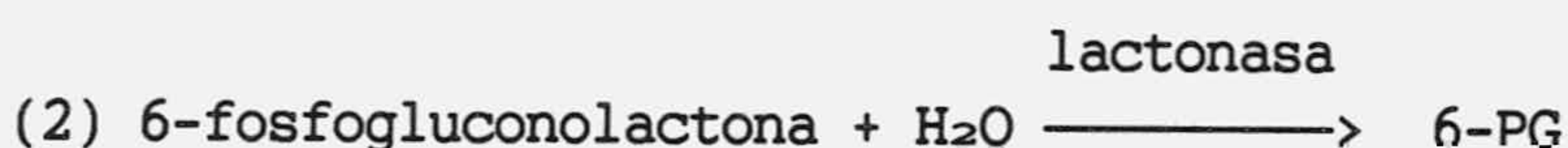
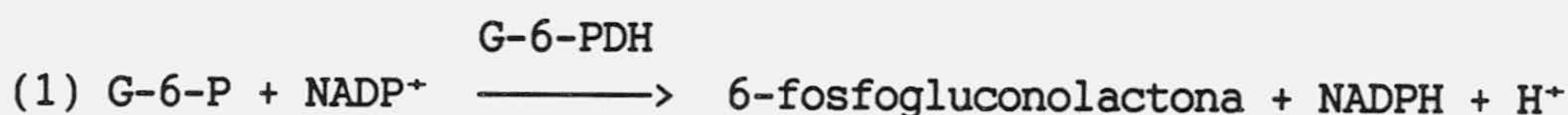
- A: actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en  $\mu\text{mol (NADP}^+) \times \text{min}^{-1} \times \text{g tejido}^{-1}$ ,
- Am: velocidad de aumento de absorbancia producida por la muestra,
- Ab: velocidad de aumento de absorbancia producida por el blanco,
- Vm: volumen de muestra en cubeta (0'030 ml), y
- $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm =  $6'22 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ .



Los extractos de tejido congelado en N<sub>2</sub> líquido y mantenido durante tres meses a -25 °C mostraron una actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa superior al 98 % de la presente en los extractos de tejido fresco. Los extractos perdieron un 2 % de su actividad a 4 °C y en 1 hora tras su preparación. Las determinaciones se realizaron en extractos de tejido congelado y en los 60 minutos siguientes a su preparación.

#### III.2.6.4. GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

La determinación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E. C. 1.1.1.49) se realizó siguiendo una modificación del método descrito por Löhr y Waller (1974). Su fundamento es el siguiente:



Una vez determinada la velocidad global, se le restó la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa previamente determinada, obteniéndose la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, como se puede observar en las ecuaciones 1, 2 y 3 cuando se usan los sustratos a concentración saturante.

Como medio de extracción se utilizó tampón trietanolamina·HCl 66'7 mM, pH 7'5 (NaOH) y Tritón X-100 1 %.

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un medio constituido por tampón trietanolamina·HCl 50 mM, pH 7'5 (NaOH), NADPNa<sub>2</sub> 1 mM, G-6-P 1 mM, 6-PG 1 mM, EDTANa<sub>4</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y muestra.

Esta determinación se realizó inmediatamente después de deter-

minar actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en las mismas muestras siguiendo el protocolo descrito en la sección III.2.6.4.

Se siguió el procedimiento descrito en la sección mencionada con las siguientes modificaciones:

1. La reacción se inició con 0'1 ml de 6-PG 10 mM y G-6-P 10 mM.

2. La determinación se realizó en el intervalo de tiempo utilizado para determinar la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en la misma muestra (sección III.2.6.3.).

3. No fue necesario preparar un blanco, pues se tomó como tal la variación de absorbancia por minuto producida por la misma muestra en la reacción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

Los cálculos se realizaron de acuerdo con la expresión (3) de la sección III.2.6.1., siendo en este caso:

A: actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en  $\mu\text{mol (NADP}^+) \times \text{min}^{-1} \times \text{g tejido}^{-1}$ ,

Am: velocidad de aumento de absorbancia producida por la muestra,

Ab: velocidad de aumento de absorbancia producida por la misma muestra en la reacción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa,

Vm: volumen de muestra en cubeta (0'030 ml), y

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm =  $6'22 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ .

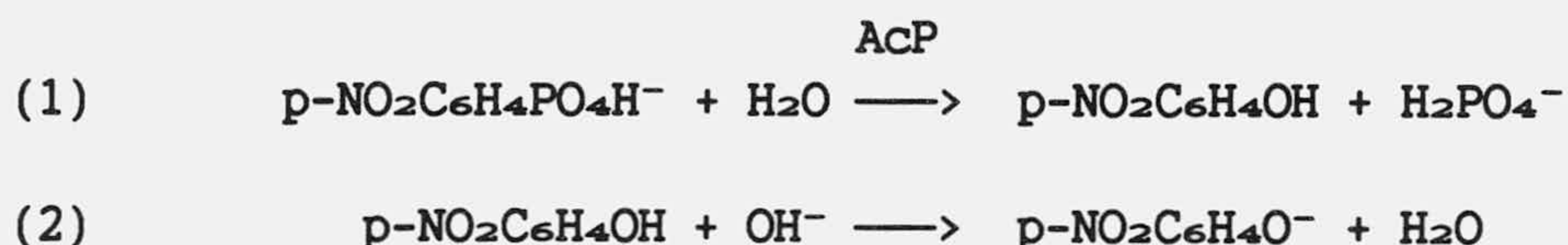
Los extractos de tejido congelado en N<sub>2</sub> líquido y mantenido durante tres meses a -25 °C mostraron una actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa superior al 98 % de la presente en los extractos de tejido fresco. Los extractos perdieron un 4 % de su actividad a 4 °C y en 1 hora tras su preparación. Las determinaciones se realizaron en extractos de tejido congelado y en los 60 minutos siguientes a su preparación.

### III.2.6.5. FOSFATASA ACIDA.

Se determinó la actividad fosfatasa ácida (E. C. 3.1.3.2.) siguiendo una modificación del método descrito por Angosto et al.

(1988).

El fundamento de la determinación es el siguiente:



La fosfatasa ácida hidroliza el p-NPP hacia p-nitrofenol, que en medio alcalino se disocia dando el ion coloreado p-nitrofenolato.

Como medio de extracción se utilizó tampón trietanolamina·HCl 66'7 mM, pH 7'5 (NaOH) y Tritón X-100 1 % (v/v).

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un medio constituido por tampón acetato sódico 87'5 mM, pH 4'8, p-NPPNa<sub>2</sub> 6 mM, y un volumen conveniente de muestra. A cada tubo de ensayo se agregaron 0,9 ml con el p-NPP y el tampón acetato necesarios para 1 ml. Tras incubarse durante 3 minutos a 25°C, se agregaron 0'1 ml de muestra previamente incubada. Se dejó transcurrir la reacción durante 7 minutos a 25°C y se detuvo con 1 ml de NaOH 0'5 M. Se midió absorbancia a 405 nm frente a un blanco preparado de igual modo, pero sustituyendo la muestra por 0'1 ml de tampón de extracción.

Los cálculos se realizaron de acuerdo con la expresión:

$$A = \frac{A_m}{7 \text{ min}} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{1}{\epsilon \times 1 \text{ cm}} \times \frac{10 \text{ ml extracto}}{\text{g tejido}}$$

siendo:

A: actividad fosfatasa ácida en  $\mu\text{mol p-NPP} \times \text{min}^{-1} \times \text{g tejido}^{-1}$ ,

A<sub>m</sub>: lectura de absorbancia producida por la muestra,

V<sub>t</sub>: volumen final en tubo (2 ml),

V<sub>m</sub>: volumen de muestra en cubeta (0'1 ml), y

ε: coeficiente de extinción molar del ion p-nitrofenolato a 405 nm =  
= 18'5 cm<sup>2</sup> x μmol<sup>-1</sup>.

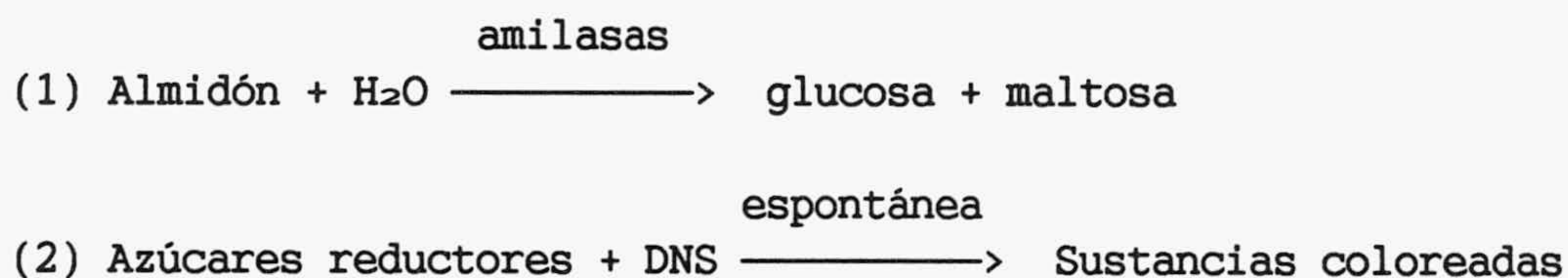
Los extractos de tejido congelado en N<sub>2</sub> líquido y mantenido durante tres meses a -25 °C presentaron una actividad fosfatasa ácida superior al 96 % de la actividad de los extractos de tejido

fresco. Los extractos perdieron menos del 2 % de su actividad a 4 °C y en 8 horas tras su preparación. Las determinaciones se realizaron en extractos de tejido congelado y en las 4 horas siguientes a su preparación.

### III.2.6.6. AMILASA.

Se determinó actividad global almidón hidrolasa ( $\alpha$ -amilasa, (E.C. 3.2.1.1.)  $\beta$ -amilasa (E.C. 3.2.1.2.) y amilo  $\alpha$ (1-6)-glucosidasa (E.C. 3.2.1.3.)) siguiendo una modificación del método descrito por Bergmeyer et al. (1974c).

El fundamento de la determinación es el siguiente:



El equilibrio de la reacción (2) está desplazado hacia la derecha. La determinación espectrofotométrica del DNS reducido en el tiempo de reacción da la actividad amilasa.

Como medio de extracción se utilizó tampón trietanolamina·HCl 66'7 mM, pH 7'5 (NaOH) y Tritón X-100 1 % (v/v).

La disolución de almidón se preparó en tampón acetato sódico 125 mM, pH 4'8 y almidón soluble de patata 0'5 %. Se agregó el almidón al tampón y para disolverlo se mantuvo durante 1 hora en baño de agua a 80-100°C con agitación continua.

El reactivo DNS se preparó con ácido 2,3-dinitrosalicílico: 1 g, NaOH 2N: 20 ml, tartrato sódico potásico tetrahidrato (sal de Rochelle): 30 g. En primer lugar al NaOH caliente se le agregó el DNS y se agitó hasta su disolución. Después se agregó el tartrato sódico potásico y unos 50 ml de agua, agitándose hasta su disolución. Finalmente se agregó agua hasta enrasar a 100 ml.

En un tubo de vidrio Pyrex se pipeteó 1 ml de disolución de almidón. Este tubo se incubó durante 3 minutos a 30°C, igual que la muestra. Se agregaron al tubo 200 µl de muestra y se dejó transcurrir la reacción durante 60 minutos a 30°C. La reacción se detuvo con 1 ml de reactivo DNS. Después se calentó el tubo en agua hirviendo durante 5 minutos, se enfrió bajo el grifo y se le agregaron 10 ml de agua destilada. Se midió la absorbancia a 546 nm frente al blanco, preparado para cada muestra; para ello se siguió el protocolo descrito, pero agregando al tubo el reactivo DNS antes que la muestra correspondiente. Cada muestra se analizó por cuadruplicado.

Se utilizó una curva patrón de maltosa (de 0 a 1'5 mM) en tampón acetato sódico 125 mM, pH 4'8. Se siguió el protocolo descrito para el tratamiento de las muestras con las modificaciones siguientes: en cada tubo se sustituyó 1 ml de disolución de almidón por 1 ml de patrón de maltosa. Se sustituyeron los 200 µl de muestra por 200 µl de agua.

La absorbancia producida por cada muestra se enfrentó a la curva patrón de maltosa obtenida para hallar la concentración de maltosa equivalente producida por la muestra en la disolución de almidón. Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la expresión:

$$A = C \times \frac{1}{60 \text{ min}} \times \frac{1 \text{ ml patrón}}{0'2 \text{ ml muestra}} \times \frac{10 \text{ ml muestra}}{\text{g tejido}}$$

que se reduce a:

$$A = \frac{5}{6} \times C$$

siendo:

A: actividad enzimática en µmol maltosa equivalente producidos en 1 minuto por gramo de mesocarpio.

C: concentración (mmol/l) de maltosa equivalente leída en la curva patrón.

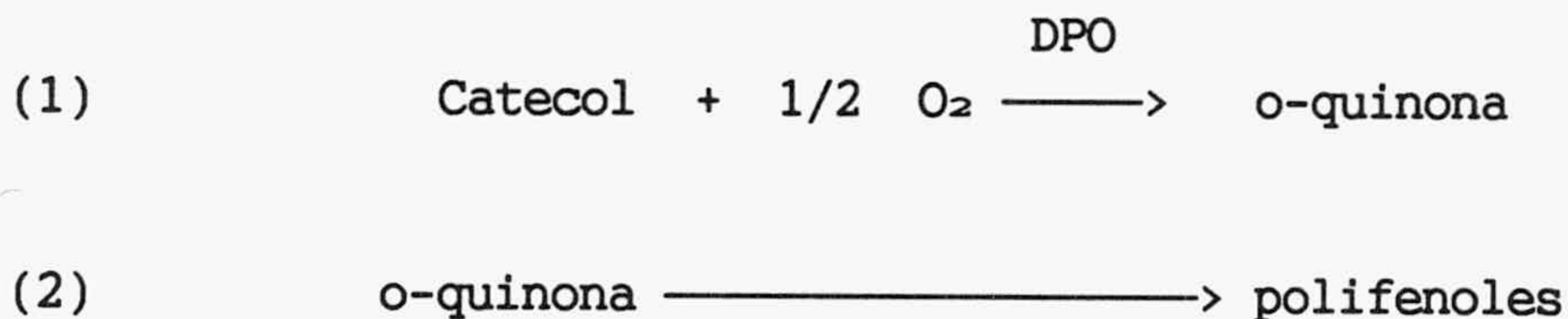
Los extractos de tejido congelado en N<sub>2</sub> líquido y mantenido durante tres meses a -25 °C presentaron una actividad amilasa supe-

rior al 95 % de la actividad de los extractos de tejido fresco. Los extractos no presentaron en 24 horas a 4°C pérdidas apreciables de actividad. Las determinaciones se realizaron en extractos de tejido congelado y en las 4 horas siguientes a su preparación.

### III.2.6.7. POLIFENOL OXIDASA.

Se conoce como actividad polifenol oxidasa al conjunto de dos reacciones químicas consecutivas, la primera de las cuales está catalizada por la actividad difenol oxidasa (E.C. 1.10.3.1). Los productos de esta reacción experimentan una polimerización espontánea que conduce a la formación de polifenoles (melaninas). La proteína que muestra actividad polifenol oxidasa también posee actividad monofenol hidroxilasa (Martínez-Cayuela *et al.*, 1988), que no ha sido objeto de estudio por nuestra parte.

La determinación se realizó siguiendo una modificación del método de Kahn (1975). Su fundamento es el siguiente:



Los polifenoles formados están fuertemente coloreados y su velocidad de formación, determinada con un espectrofotómetro, es una medida de la actividad polifenol oxidasa.

Como medio de extracción se utilizó tampón fosfato potásico 80 mM, pH 7'4, Tritón X-100 1 % (v/v).

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un medio constituido por tampón fosfato potásico 0'1 M, pH 6'7, catecol 10 mM y muestra. El tampón fosfato se incubó durante 30 minutos a 25°C en un matraz Erlenmeyer cuya capacidad fue al menos el doble que su contenido. Para formar una disolución saturada de O<sub>2</sub> se agitó de modo enérgico cada 3-5 minutos, dejando el matraz abierto después de agitar. Después se disolvió el catecol, incubando y agitando de igual modo durante 15 minutos antes de medir.

A cada cubeta se le agregaron 3 ml de medio de ensayo y después se incubó durante 3 minutos a 25°C en el carro del espectrofotómetro. Se le agregaron 15 µl de muestra, se agitó invirtiendo la cubeta 2 veces y se midió la variación de absorbancia por minuto a 410 nm entre el minuto 0'5 y 1'5. Cada muestra se analizó por triplicado.

La reacción no es lineal debido al consumo de O<sub>2</sub>, que ya desde el principio no está a concentración saturante, y a la inactivación progresiva del enzima por los productos de la reacción. Sin embargo, en las condiciones e intervalo de medida descritas la desviación de la linealidad es pequeña.

La estequiometría de los polifenoles formados y, por consiguiente, su coeficiente de extinción, depende de las condiciones en que tiene lugar la reacción. Por esta causa se suele expresar la actividad polifenol oxidasa en unidades de incremento de absorbancia por minuto. Para el cálculo se ha utilizado la expresión siguiente:

$$APPO = A \times \frac{V_c}{V_m} \times \frac{10 \text{ ml muestra}}{\text{g tejido}}$$

siendo:

APPO: actividad PPO en unidades de absorbancia a 410 nm por minuto y gramo de tejido,

A: variación de absorbancia por minuto,

V<sub>c</sub>: volumen de reacción en cubeta (3'015 ml), y

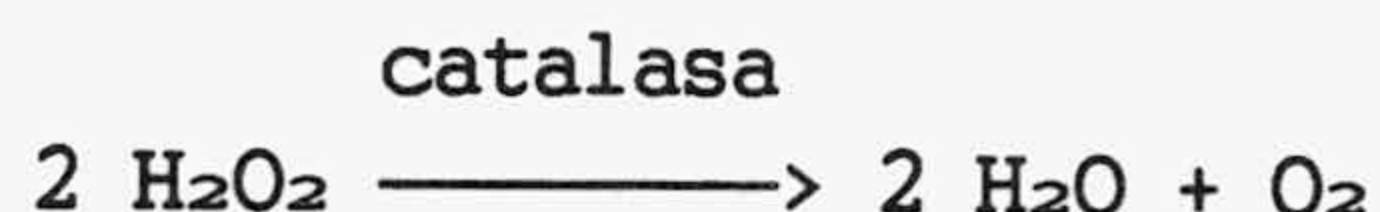
V<sub>m</sub>: volumen de muestra en cubeta (0'015 ml).

Los extractos de tejido congelado a -25°C y mantenido durante tres meses a -25 °C presentaron una actividad polifenol oxidasa superior al 98 % de la actividad de los extractos de tejido fresco. Los extractos perdieron en 2 horas a 4°C un 3 % de su actividad. Las determinaciones se realizaron en extractos de tejido congelado y en los 60 minutos siguientes a su preparación.

### III.2.6.8. CATALASA.

La actividad catalasa se determinó siguiendo una modificación

del método descrito por Bergmeyer et al. (1974d). Su fundamento es el siguiente:



Se midió con el espectrofotómetro directamente la velocidad de descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleada fue inferior a la de saturación del enzima para evitar la rápida inactivación por oxidación de éste.

Como medio de extracción se utilizó tampón fosfato potásico 0'1 M, pH 6'7, Tritón X-100 1 % (v/v).

La disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se preparó con tampón fosfato potásico 0'1 M, pH 6'7,  $\text{H}_2\text{O}_2$  12'5 mM (debe dar una absorbancia a 240 nm de  $0'500 \pm 0'010$ ).

La determinación se efectuó a 25°C en una mezcla de reacción (2'9 ml) que contenía  $\text{H}_2\text{O}_2$  12'5 mM en tampón fosfato potásico 0'1 M, pH 6'7. La actividad enzimática en  $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \times \text{m}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ , se calculó a partir de la expresión:

$$(1) \quad A = \frac{V_c}{V_m} \times \frac{1}{\epsilon \times 1 \text{ cm}} \times \frac{10 \text{ ml extracto}}{\text{g tejido}}$$

A: actividad catalasa en  $\mu\text{mol (H}_2\text{O}_2) \times \text{min}^{-1} \times \text{g tejido}^{-1}$ ,

$A_m$ : velocidad de aumento de absorbancia producida por la muestra,

$V_c$ : volumen de reacción en cubeta (2'96 ml),

$V_m$ : volumen de muestra en cubeta (0'06 ml), y

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm =  $0'040 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ .

Los extractos de tejido congelado a -25°C y mantenido durante tres meses a -25 °C presentaron una actividad que era aproximadamente el 90 % de la actividad de los extractos de tejido fresco. Los extractos no sufrieron pérdidas significativas de actividad a 4°C en la 24 horas siguientes a su preparación. Las determinaciones se realizaron en extractos de tejido congelado y en las 6 horas siguientes a su preparación.



### III.2.7. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Los extractos de mesocarpio se prepararon con tejido fresco como se describe en III.2.6., utilizándose como tampón de extracción tampón fosfato potásico 80 mM, pH 7'4 y Tritón X-100 1 % (v/v).

La técnica de determinación fue la de Bradford (1976). El reactivo colorante se preparó del modo siguiente: 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 se disolvieron en 50 ml de etanol del 95 % o, para facilitar aún más la disolución, en 50 ml de etanol absoluto. A esta disolución se le agregaron 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> del 85 % (p/v). La disolución resultante se diluyó hasta 1 l con H<sub>2</sub>O destilada. Este reactivo es estable a temperatura ambiente, aunque a veces es necesario filtrarlo antes de usarlo.

En cada tubo de ensayo se pusieron 10 µl de cada extracto de proteínas preparado según el método descrito más arriba. Se agregaron 90 µl de H<sub>2</sub>O destilada y 5 ml del reactivo colorante de proteínas y se agitó inmediatamente con un agitador de vórtex. Se leyó la absorbancia a 595 nm entre 5 y 20 minutos tras la adición del reactivo colorante.

El cero de absorbancia del espectrofotómetro se ajustó previamente con un blanco. La concentración de proteínas se halló mediante una curva patrón realizada con la fracción V de la albúmina de suero bovino disuelta en H<sub>2</sub>O destilada a 1 mg/cc. A cada tubo además se agregaron 10 µl de tampón de extracción de proteínas y el volumen de H<sub>2</sub>O necesario para llevarlo hasta 100 µl. Así se obtuvieron 6 tubos con 100 µl de 0, 0'1, 0'2, 0'3, 0'4 y 0'5 mg proteína/ml.

Una vez conocida del modo descrito la concentración de proteínas en el extracto (CP<sub>extracto</sub>), la concentración de proteínas en el mesocarpio (CP<sub>mesocarpio</sub>) se calculó así:

$$CP_{\text{mesocarpio}} \text{ (mg/g tejido)} = 10 \times CP_{\text{extracto}} \text{ (mg/ml)}$$

### III.2.8. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Cada dato analítico expresado en las tablas es la media aritmética de 6 valores, uno por cada fruto analizado (excepto en el caso de las determinaciones de etanol, en el que cada dato es la media de

6 medidas de un extracto conjunto de 6 frutos), y a su derecha figura el error estándar de la media (S.E.M.) precedido del signo  $\pm$ .

El número de cifras significativas del S.E.M. ha sido de 2 o 3, elegido de acuerdo con el criterio de Sokal y Rohlf (1969): cuando la primera cifra significativa es 1 o 2, la S.E.M. se expresa con 3 cifras significativas; si la primera cifra significativa es mayor de 2, la S.E.M. se expresa con sólo dos cifras significativas.

En la expresión de la media aritmética, la cifra significativa de menor orden de magnitud empleada siempre tiene un orden de magnitud 10 veces superior a la cifra significativa de la S.E.M. de menor de magnitud (Sokal y Rohlf, 1969).

La comparación entre distintas poblaciones de datos se realizó mediante el test estadístico de la  $t$  de Student con ayuda del programa EPISTAT y otro "software" en lenguaje BASIC programado por el Dr. Vargas Morales.

La comparación entre proporciones diferentes obtenidas mediante tratamientos distintos se ha hecho mediante un procedimiento estadístico de comparación de proporciones de grupos independientes (Schwartz, 1991).

## **RESULTADOS**

#### IV. RESULTADOS.

##### IV.1. INFECCIONES MICOTICAS POSTRECOLECCION.

No es raro observar infecciones micóticas en las chirimoyas durante su maduración en condiciones normales. Sin embargo, se manifiestan en forma de colonias que crecen sólo en un área muy restringida: el punto de unión al pedúnculo del fruto, lo que supone menos de 1 cm<sup>2</sup> de superficie. Este punto de unión está localizado en la zona más profunda de una depresión formada por una invaginación del epicarpio. Las colonias se hacen visibles cuando el fruto ya está maduro, pero no suponen una pérdida de valor comercial, pues es raro que afecten a su pulpa y, al crecer en una superficie tan pequeña, su aspecto externo no se ve perjudicado.

Durante la realización de experimentos cuyo objetivo ha sido la puesta a punto de un método de conservación de los frutos, éstos se han mantenido en ambientes de elevada humedad relativa, lo que favorece el inicio y desarrollo de las infecciones micóticas. Además, al prolongar el período de maduración se incrementa la probabilidad de desarrollo de infecciones que puedan arruinar los frutos. Tras la realización de algunos experimentos de conservación en los que un porcentaje notable de los frutos sufrió severas micosis se decidió iniciar los estudios conducentes a seleccionar un tratamiento fungicida adecuado.

##### IV.1.1. INFECCIONES MICOTICAS EN FRUTOS NO TRATADOS CON FUNGICIDAS.

Todos los frutos fueron lavados con una disolución del detergente Deccosol C a su llegada al laboratorio (III.2.1.1), fuesen o no tratados posteriormente con fungicidas.

El porcentaje de frutos que desarrollan micosis y la severidad de los daños causados sufren grandes oscilaciones de unas partidas de frutos a otras y se incrementa a medida que transcurre el tiempo de conservación. A 12°C frecuentemente rebasa el 20 % el 90 DTR (día tras la recolección).

Los cultivos de los tejidos infectados y los subsecuentes estudios taxonómicos realizados permitieron identificar hongos de los géneros y especies Botrytis cinerea, Alternaria spp., Fusarium spp., Penicillium spp., Aspergillus spp. y Rhizopus spp.. Los más frecuentes fueron los tres primeros mencionados. A veces se encontraron infecciones dobles y triples en el mismo fruto.

#### IV.1.2. TRATAMIENTOS CON FUNGICIDAS.

##### -Estudio de la eficacia del Imazalil.

Se utilizaron frutos recolectados en Motril en la época temprana. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Grupo control: 200 frutos lavados con disolución detergente (III.2.1.1.) y refrigerados a  $12 \pm 0'5^{\circ}\text{C}$  y  $85 \pm 5 \%$  de humedad relativa.
- Grupo Imazalil: 207 frutos lavados como los controles y a continuación tratados con Imazalil al  $0'05 \%$  (III.2.1.2.) y refrigerados como los controles.

Los frutos se examinaron el 10º DTR, detectándose distintos tipos de micosis en el grupo control que afectaban al 30 % de ellos. Su incidencia se elevó al 65 % en los 3 días siguientes. Todas las infecciones debidas a B. cinerea observadas el 13º DTR se habían manifestado ya desde al menos 3 días antes (Tabla I).

Por el contrario, únicamente un 2'4 % del total de frutos tratados con Imazalil resultaron infectados. Todas las micosis observadas en este grupo se debían a B. cinerea. La aplicación de la metodología estadística de comparación de grupos independientes (Schwartz, 1991) reveló que la diferencia en el porcentaje de infecciones existente entre el grupo control y el grupo Imazalil tiene un grado de significación de  $p < 0'001$ . Posteriores experimentos de conservación de frutos tratados con Imazalil y refrigerados a  $12^{\circ}\text{C}$  arrojaron porcentajes de frutos afectados que oscilaban entre 0 y 4 %, siendo muy rara la presencia de hongos no pertenecientes al género Botrytis.

Estos datos nos permitieron establecer la efectividad del Imazalil en la prevención de ataques fúngicos y se decidió su uso

Tabla I. Eficacia del Imazalil en la prevención de ataques fúngicos en chirimoyas refrigeradas a 12°C.

	Porcentajes de frutos infectados			
	100 DTR		130 DTR	
	Total	Botrytis	Total	Botrytis
Grupo control:	30	20	65	20
Grupo Imazalil:	2'4	=	=	=

-Las columnas "Total" indican el porcentaje de frutos de cada grupo en los que se observó algún tipo de micosis, mientras que "Botrytis" indica el hallazgo de Botrytis cinerea.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda de la misma línea.

rutinario con los frutos llegados al laboratorio, aunque su eficacia no es total en el control de las infecciones causadas por B. cinerea.

#### **-Estudio de la eficacia de fungicidas distintos del Imazalil.**

Se realizaron varios experimentos de tratamiento de frutos con diferentes fungicidas aplicados mediante disoluciones detergentes. Los frutos fueron refrigerados a 12°C tras el tratamiento y la aparición de infecciones fúngicas fue contrastada en cada experimento con un lote control de frutos. Los fungicidas ensayados fueron los siguientes:

- Tiabendazol 1.000 ppm
- CaCl<sub>2</sub> 4 % (p/v)
- CaCl<sub>2</sub> 4 % + Tiabendazol 1.000 ppm
- "Ventine MZ" (nombre comercial, de Ciba-Geigy) 2'5 g/l, lo que supone una concentración de Mancozeb (componente activo) del 0'2 % (p/v).
- "Ridomil MZ 72" (nombre comercial, de Ciba-Geigy) 2'5 g/l, lo que supone una concentración de Mancozeb del 0'16 % y de Metalaxil del 0'2 % (p/v) (componentes activos).
- "Fibenzol" (nombre comercial, de ICI Zeltia) hasta una concen-

tración de Benomilo (componente activo) del 0'05 % (p/v).  
-"Ridomil Combi 50" (nombre comercial, de Ciba-Geigy) hasta unas concentraciones de Metalaxil de 0'02 % y Folpet de 0'08 % (p/v) (componentes activos).

El tratamiento se realizó de un modo similar al descrito para el Imazalil (III.2.1.2.) pero con las concentraciones arriba indicadas para cada fungicida.

Los tratamientos efectuados con estos fungicidas mostraron una baja eficacia en la prevención de las micosis.

#### **IV.2. ESTUDIO DE LA MADURACION EN CONDICIONES NORMALES: 20 Y 23°C.**

Nuestro primer objetivo fue conocer el proceso de maduración de estos frutos en condiciones normales. Para ello se ha estudiado la evolución de distintos parámetros fisiológicos y bioquímicos relacionados con este proceso.

Tras su recolección, los frutos suelen madurar en su zona de origen bajo unas condiciones ambientales medias que oscilan en torno a los 20°C y 80 ± 10 % de humedad relativa. Para el estudio de la maduración en condiciones normales en el laboratorio se han escogido 20 y 23°C, y 80 ± 10 % de humedad relativa. Los resultados de los parámetros medidos en estas condiciones pueden ser útiles como patrón de referencia para el estudio de la maduración en condiciones ambientales diferentes.

#### **-Concentración tisular y producción de etileno en frutos madurados a 20 y 23°C.**

La concentración de etileno presente en el tejido de los frutos que maduran a 20°C experimentó un dramático ascenso desde el comienzo de su maduración, alcanzando un máximo el 6º día tras su recolección (DTR), cuando los frutos estaban muy maduros y comenzaban a senescer (Tabla II). Después de este máximo se inició un suave descenso.

Tabla II. Concentración de etileno tisular en chirimoyas maduras a 20 y 23°C.

Procedencia:	Motril	
Epoca:	temprana	
DTR	20°C	23°C
0	0'029 ± 0'0053	0'24 ± 0'063
1	0'068 ± 0'0036	
2	0'112 ± 0'0220 <sup>b</sup>	
3	0'45 ± 0'071 <sup>c</sup>	2'0 ± 0'76 <sup>a</sup>
4	1'75 ± 0'270 <sup>c</sup>	6'2 ± 1'50 <sup>b</sup>
5	19'4 ± 2'67 <sup>c</sup>	3'0 ± 1'21 <sup>a</sup>
6	22 ± 4'9 <sup>b</sup>	
7	16'3 ± 2'62 <sup>c</sup>	
8	13 ± 4'0 <sup>b</sup>	

-La concentración de etileno tisular se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

La concentración de etileno tisular en chirimoyas que maduran a 23°C muestra una evolución similar a la observada a 20°C aunque con dos diferencias notables. En primer lugar, el valor máximo se alcanzó el 4º día tras la recolección. Por otra parte, la magnitud del máximo a 23°C es significativamente menor que la alcanzada a 20°C.

La producción de etileno (Figura 2, pág. 95) mostró una evolución semejante, aunque el pico aparece ligeramente retrasado.

#### -Parámetros físicos y fisicoquímicos de maduración a 20 y 23°C.

El contenido en sólidos solubles totales aumentó rápidamente en los primeros días de la maduración, ralentizándose este aumento una vez que los frutos habían madurado (Tablas III y IV). El valor máximo en la maduración a 20°C se alcanzó en frutos plenamente maduros e incluso comenzando a senescer (6º DTR) y a continuación se estabilizó. Los frutos que maduraron a 23°C alcanzaron el máximo un día antes (Tabla IV), estando también ligeramente senescentes. El



Tabla III. Parámetros físicos y fisicoquímicos de maduración a 20°C.

Procedencia:		Motril		
Epoca:		temprana		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	8'07±0'251	6'10±0'132	100±4'0	0
1	9'17±0'088 <sup>b</sup>	6'07±0'128	92±4'6	1'20±0'030 <sup>c</sup>
2	11'0±0'71 <sup>b</sup>	5'89±0'153	81±3'1 <sup>b</sup>	2'16±0'031 <sup>c</sup>
3	16'8±0'72 <sup>c</sup>	5'39±0'116 <sup>b</sup>	49±3'3 <sup>c</sup>	4'5±0'61 <sup>c</sup>
4	19'6±0'86 <sup>c</sup>	5'25±0'151 <sup>b</sup>	23±3'3 <sup>c</sup>	7'29±0'269 <sup>c</sup>
5	21'6±0'61 <sup>c</sup>	4'623±0'0291 <sup>c</sup>	3'1±0'44 <sup>c</sup>	8'9±0'42 <sup>c</sup>
6	24'4±0'65 <sup>c</sup>	4'36±0'044 <sup>c</sup>	1'7±0'00 <sup>c</sup>	11'01±0'256 <sup>c</sup>
7	23'5±0'83 <sup>c</sup>	4'272±0'0183 <sup>c</sup>	< 0'8	11'72±0'296 <sup>c</sup>
8	23'8±0'65 <sup>c</sup>	4'43±0'037 <sup>c</sup>	< 0'8	14'6±0'35 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

incremento del valor de este parámetro depende principalmente de la degradación del almidón presente en el mesocarpio.

El pH del mesocarpio de los frutos que maduraron a 20°C y a 23°C descendió notablemente durante la maduración, estabilizándose cuando los frutos ya estaban muy maduros y comenzaban a senescer (Tablas III y IV). La evolución fue más rápida a 23°C. El valor de este parámetro depende fundamentalmente de la biosíntesis de ácidos carboxílicos del ciclo del ácido cítrico, que a su vez depende de la disponibilidad de glucosa procedente en parte de la hidrólisis de almidón.

La textura del mesocarpio, índice del grado de hidrólisis y solubilización de las pectinas que contribuyen a la firmeza de este tejido, comenzó a disminuir desde el inicio de la maduración y prosiguió después de alcanzado el grado de maduración óptimo para el consumo (Tabla III). A 23°C el proceso fue más rápido (Tabla IV).

Tabla IV. Parámetros físicos y fisicoquímicos de maduración a 23°C.

Procedencia: Motril				
Epoca: temprana				
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	6'41±0'278	6'23±0'041	97'5±5'94	0
3	20'5±0'59 <sup>c</sup>	4'84±0'112 <sup>c</sup>	17±9'2 <sup>c</sup>	6'07±0'152 <sup>c</sup>
4	23'9±0'45 <sup>c</sup>	4'38±0'069 <sup>c</sup>	2'8±0'77 <sup>c</sup>	8'1±0'45 <sup>c</sup>
5	24'4±1'43 <sup>c</sup>	4'56±0'151 <sup>c</sup>	1'7±0'00 <sup>c</sup>	10'8±1'58 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

La pérdida de peso de los frutos tiene un interés fundamentalmente económico. Es interesante, desde este punto de vista, comparar los datos correspondientes a la maduración de los frutos en condiciones normales y bajo diferentes condiciones de conservación. Como era de esperar, los frutos perdieron peso progresivamente (Tablas III y IV). La magnitud de la pérdida de peso depende de dos factores fundamentalmente: temperatura y humedad ambiente. Las diferencias no son estadísticamente significativas.

#### -Concentración de etanol en mesocarpio de frutos madurados a 20°C.

La concentración de etanol sólo fue detectable a partir del 3º DTR y experimentó un aumento intenso y continuado durante el proceso de maduración y senescencia del fruto (Tabla V). El aumento de concentración fue dramático entre el 5º y 6º DTR, pues la concentración se multiplicó por un factor de 12'5. Este comportamiento también se ha observado en frutos procedentes de Motril y Jete recolectados en diferentes épocas.

Tabla V. Concentración de etanol en mesocarpio de frutos madurados a 20°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	temprana
DTR	
0	< 2'5
2	< 2'5
3	3'25 ± 0'290
4	11'3 ± 1'08 <sup>c</sup>
5	35'7 ± 1'76 <sup>c</sup>
6	448 ± 9'8 <sup>c</sup>
7	620 ± 5'5 <sup>c</sup>
8	1802 ± 7'9 <sup>c</sup>

-La concentración de etanol en mesocarpio está expresada en ng por g de mesocarpio.

-Los resultados representan la media aritmética de 6 medidas de un extracto conjunto de 6 frutos ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores del día 0 tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

#### -Concentración de proteínas en mesocarpio de frutos madurados a 20°C.

La concentración de proteínas registró un suave incremento en los días previos a la madurez del fruto, disminuyendo a continuación (Tabla VI). Este comportamiento es similar al observado en frutos recolectados en Motril y Jete en diferentes épocas.

#### -Actividades enzimáticas en mesocarpio de frutos madurados a 20°C.

La actividad alanina aminotransferasa comenzó a disminuir después del 2º DTR, alcanzando un mínimo cuando los frutos llegaron a la madurez (5º DTR) (Tabla VII). La actividad aspartato aminotransferasa, por el contrario, no experimentó cambios significativos a lo largo del proceso de maduración.

Las actividades glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa se incrementaron durante el 2º y 3º DTR, disminuyendo posteriormente a valores incluso inferiores a los inicia-

Tabla VI. Concentración de proteínas en mesocarpio de frutos madurados a 20°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	temprana
DTR	
0	5'19 ± 0'079
2	6'12 ± 0'132 <sup>c</sup>
3	7'82 ± 0'146 <sup>c</sup>
4	7'57 ± 0'098 <sup>c</sup>
5	5'74 ± 0'038 <sup>c</sup>
6	6'13 ± 0'093 <sup>c</sup>
7	5'71 ± 0'063 <sup>c</sup>
8	6'32 ± 0'079 <sup>c</sup>

-La concentración de proteínas está expresada en mg por g de tejido.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores del día 0 tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

les (Tabla VII). Estos cambios son únicamente significativos el 30 DTR para la 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

La actividad fosfatasa ácida comenzó a aumentar durante la maduración hasta alcanzar un máximo el 40 DTR, tras lo cual comenzó a descender, alcanzando el 60 y 70 DTR niveles similares a los del 10 DTR. La diferencia entre los valores máximo y mínimo registrados no alcanza el 70 %, lo que indica que a pesar de registrar oscilaciones notables, existe una actividad basal de enzima que no es despreciable (Tabla VIII).

La actividad amilasa fue en aumento a medida que progresaba la maduración hasta alcanzar un máximo el 40 y 50 DTR y después comenzó a decrecer. La magnitud del máximo fue aproximadamente el doble de la existente el 10 DTR (Tabla VIII).

La actividad polifenol oxidasa decreció rápidamente desde el inicio de la maduración y se estabilizó a partir del 30 DTR en valores próximos al 50 % de los medidos el 10 DTR (Tabla VIII).

Tabla VII. Actividades alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en mesocarpio de frutos madurados a 20°C.

Procedencia:		Jete		
Epoca:		tardía		
DTR	ALAT	ASAT	6-PGDH	G-6-PDH
1	8'0±0'77	8'2±0'43	1'52±0'083	1'42±0'075
2	9'2±1'31	8'1±0'61	1'78±0'146	1'75±0'168
3	3'7±0'72 <sup>b</sup>	7'5±0'65	1'92±0'121 <sup>a</sup>	1'69±0'179
4	3'4±0'35 <sup>c</sup>	8'2±0'87	1'70±0'102	1'62±0'112
5	1'88±0'296 <sup>c</sup>	7'6±0'58	1'48±0'039	1'55±0'091
6	2'3±0'31 <sup>c</sup>	8'8±1'05	1'64±0'126	1'47±0'114
7	2'9±0'39 <sup>c</sup>	7'1±0'98	1'57±0'041	1'14±0'117

-La actividad ALAT se expresa en  $\mu\text{mol (L-Ala) x min}^{-1} \text{ x g}^{-1}$  mesocarpio.

-La actividad ASAT se expresa en  $\mu\text{mol (L-Asp) x min}^{-1} \text{ x g}^{-1}$  mesocarpio.

-Las actividades 6-PGDH y G-6-PDH se expresan en  $\mu\text{mol NADP}^+ \text{ x min}^{-1} \text{ x g}^{-1}$  mesocarpio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

El nivel de actividad catalasa permaneció aproximadamente constante durante el proceso de maduración. Comenzó a descender una vez que se inició la senescencia de los frutos (Tabla VIII).

#### -Observaciones de tipo organoléptico en frutos madurados a 20 y 23°C.

Se han realizado catas de grupos de 6 frutos recolectados en Motril y Jete a lo largo de toda la temporada de recolección, obteniéndose resultados similares.

Los frutos incubados a 20°C estaban aún enteros el 4º DTR y plenamente maduros el 5º DTR. El día siguiente su pulpa comenzó a adquirir un sabor y aroma a alcoholes característico de los frutos

Tabla VIII. Actividades fosfatasa ácida, amilasa, polifenol oxidasa y catalasa en mesocarpio de frutos madurados a 20°C.

Procedencia:		Jete		
Epoca:		tardía		
DTR	AcP	amilasa	PPO	catalasa
1	1'14±0'102	0'41±0'048	126±14'5	826±47
2	1'26±0'040	0'78±0'132 <sup>a</sup>	94±8'3	780±62
3	1'86±0'147 <sup>b</sup>	0'760±0'0242 <sup>c</sup>	53±9'6 <sup>b</sup>	730±106
4	1'93±0'137 <sup>c</sup>	0'86±0'058 <sup>c</sup>	62±9'5 <sup>b</sup>	780±53
5	1'40±0'131	0'86±0'065 <sup>c</sup>	62±6'5 <sup>b</sup>	710±43
6	1'29±0'100	0'70±0'037 <sup>c</sup>	55±6'8 <sup>b</sup>	570±49 <sup>b</sup>
7	1'19±0'112	0'66±0'034 <sup>b</sup>	52±5'5 <sup>c</sup>	450±79 <sup>b</sup>

-La actividad AcP se expresa en  $\mu\text{mol p-NPP} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio

-La actividad amilasa se expresa en  $\mu\text{mol maltosa equivalente} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-La actividad PPO se expresa en unidades de absorbancia a 410 nm  $\times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-La actividad catalasa se expresa en  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

senescentes que se intensificó en días sucesivos. El pardeamiento de los carpelos comenzó en los bordes de algunos de ellos el 4º DTR y progresó de modo continuo, habiéndose pardeado el fruto completo entre el 6º y 7º DTR.

Los frutos incubados a 23°C completaron su maduración el 4º DTR. Los fenómenos de senescencia observados fueron similares a los que se manifestaron a 20°C, aunque tuvieron lugar con un día de adelanto.

#### IV.3. EFECTO DE LA REFRIGERACION A DISTINTAS TEMPERATURAS SOBRE LA MADURACION.

Una vez conocido el comportamiento del fruto durante su maduración en condiciones normales, es conveniente estudiar detalles de

este proceso cuando se desarrolla a diferentes temperaturas, ya que la refrigeración es una técnica frecuentemente aplicada en la conservación de frutos.

#### IV.3.1. INERCIA TERMICA DE LOS FRUTOS.

Antes de realizar un estudio del comportamiento de los frutos bajo refrigeración es conveniente conocer cuál es la inercia que muestran frente a los cambios térmicos. Para ello se tomaron varias chirimoyas con un peso de  $300 \pm 1$  g recolectadas en la zona de Motril en la época temprana de la temporada de recolección. Se estudió la evolución de la temperatura del centro de los frutos refrigerados a  $1^{\circ}\text{C}$  o a  $12^{\circ}\text{C}$ . También se estudió la disminución de la temperatura de varios frutos a 2 cm bajo su epicarpio.

En la figura 1 se muestran los datos de enfriamiento de un fruto introducido en la cámara de  $1^{\circ}\text{C}$ . La temperatura descendió a una velocidad ligeramente superior a 2 centímetros por debajo de la superficie del fruto que en su centro, lo cual demuestra la existencia de un gradiente de temperatura en el interior del fruto observable especialmente durante las 2 primeras horas de enfriamiento.

El estudio de inercia térmica se repitió con varios frutos de peso similar y forma regular, obteniéndose curvas prácticamente idénticas. En cualquier caso, el fruto necesita 5 horas para alcanzar la temperatura de  $2^{\circ}\text{C}$  en estas condiciones.

También se muestra en la figura 1 el enfriamiento de un fruto refrigerado a  $12^{\circ}\text{C}$ . El fruto refrigerado a  $1^{\circ}\text{C}$  se enfría más rápidamente que el refrigerado a  $12^{\circ}\text{C}$  debido a la existencia de un gradiente de temperatura más elevado en el primer caso. Sin embargo, el comportamiento es cualitativamente idéntico al mostrado por el fruto refrigerado a  $1^{\circ}\text{C}$ . En estas condiciones se necesitaron 5 horas para que la temperatura se redujera a  $14^{\circ}\text{C}$ .

En todos los casos el enfriamiento se fue haciendo más lento a medida que disminuyó la temperatura de los frutos; esto se debe a que la transferencia de calor es tanto más lenta cuanto más pequeño es el gradiente de temperatura entre el fruto y el aire que lo rodea.

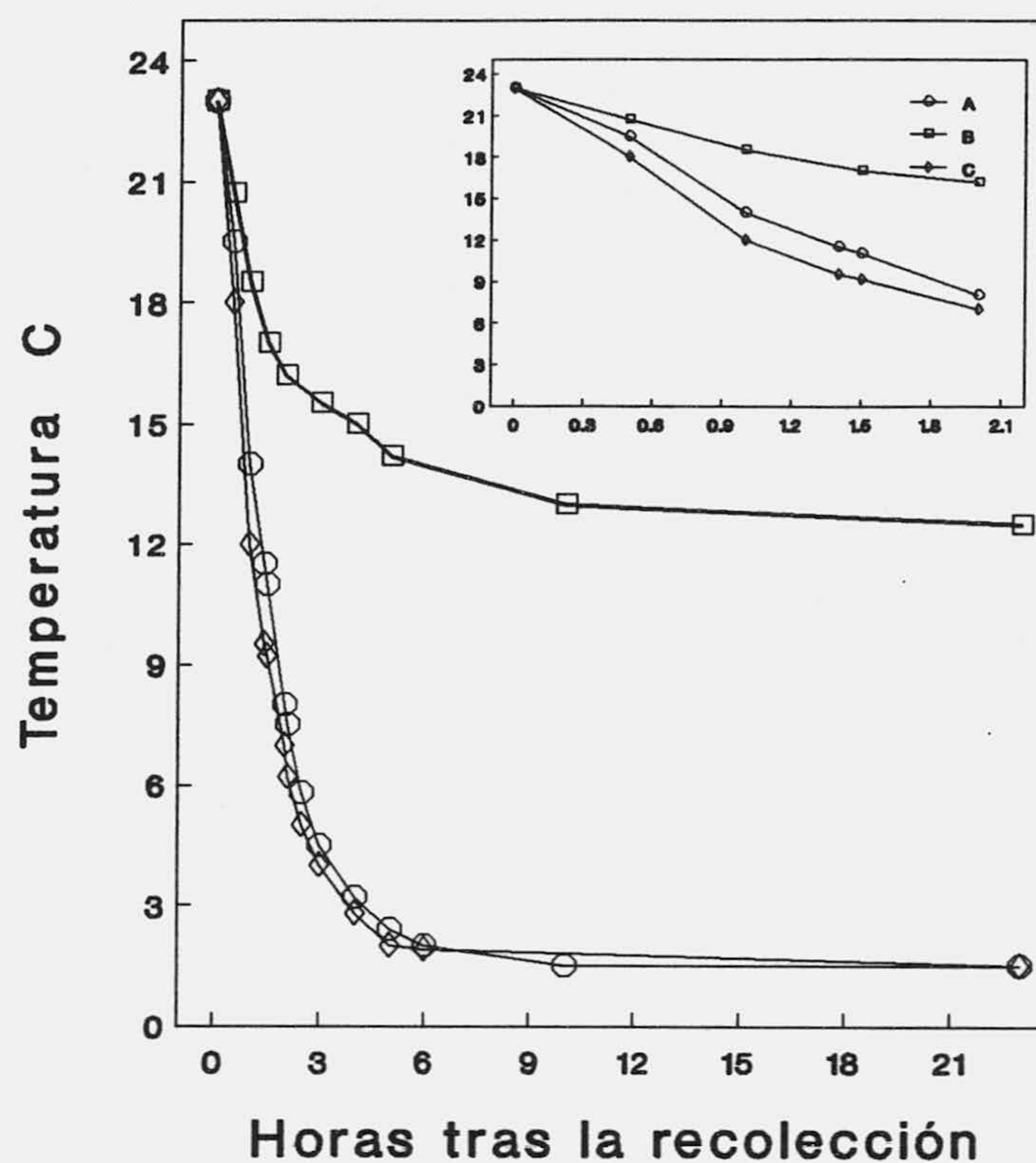


Figura 1. Disminución de la temperatura al refrigerar 3 frutos inicialmente a 23°C. La curva A muestra la evolución de la temperatura del centro de un fruto cuando se refrigera a 1°C. La curva B corresponde a unas condiciones similares pero con refrigeración a 12°C. La curva C corresponde a la evolución de la temperatura 2 cm bajo la piel de un fruto refrigerado a 1°C.

#### IV.3.2. REFRIGERACION A TEMPERATURA CONSTANTE: 12°C.

El estudio del efecto que ejerce la refrigeración sobre la maduración se realizó a distintas temperaturas. A continuación se exponen los resultados observados refrigerando los frutos a una temperatura constante de 12°C y humedad relativa de  $85 \pm 5$  %.

#### -Concentración tisular de etileno en frutos madurados a 12°C.

La concentración de etileno presente en el tejido de los frutos que maduraron a 12°C experimentó un incremento continuado desde el



Tabla IX. Concentración de etileno tisular en chirimoyas maduras a 12°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	temprana
DTR	12°C
0	0'029 ± 0'0053
3	0'082 ± 0'0243
5	0'21 ± 0'044
7	2'1 ± 0'34 <sup>c</sup>
9	5'8 ± 0'86 <sup>c</sup>
11	16'9 ± 2'26 <sup>c</sup>
13	29 ± 3'6 <sup>c</sup>
15	93 ± 19'0 <sup>c</sup>

-La concentración de etileno tisular se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

comienzo de su maduración hasta el 15º DTR, momento en que el fruto ya había entrado en la senectud (Tabla IX). Se ha observado el mismo comportamiento en frutos recolectados en Motril y en Jete en diferentes épocas.

#### -Parámetros físicos y fisicoquímicos de maduración a 12°C

El contenido en SST aumentó progresivamente durante la maduración (Tabla X), ralentizándose este incremento un día antes de alcanzar la madurez (12º DTR). El valor máximo se alcanzó en frutos que iniciaban su senescencia.

El pH del mesocarpio de los frutos disminuyó durante la maduración (Tabla X). La disminución de este parámetro continuó después de alcanzado el estado de madurez, aunque lo hizo a un ritmo más lento.

La textura del mesocarpio comenzó a disminuir desde el inicio de la maduración y prosiguió hasta la senectud (15º DTR, Tabla X).

Tabla X. Parámetros físicos y fisicoquímicos de maduración a 12°C.

Procedencia:		Motril		
Epoca:		temprana		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	8,07±0'251	6'10±0'132	100±4'0	0
3	11'7±0'36 <sup>c</sup>	6'08±0'088	76±8'1 <sup>a</sup>	1'69±0'110 <sup>c</sup>
5	14'1±0'50 <sup>c</sup>	5'81±0'102	60±7'5 <sup>c</sup>	2'69±0'090 <sup>c</sup>
7	18'0±0'79 <sup>c</sup>	5'24±0'080 <sup>c</sup>	51'5±2'66 <sup>c</sup>	3'97±0'199 <sup>c</sup>
9	20'8±0'68 <sup>c</sup>	4'91±0'062 <sup>c</sup>	8'6±1'35 <sup>c</sup>	4'67±0'174 <sup>c</sup>
11	22'6±0'50 <sup>c</sup>	4'50±0'059 <sup>c</sup>	3'2±0'68 <sup>c</sup>	6'10±0'231 <sup>c</sup>
13	23'21±0'140 <sup>c</sup>	4'47±0'049 <sup>c</sup>	3'04±0'277 <sup>c</sup>	7'8±0'33 <sup>c</sup>
15	24'4±0'62 <sup>c</sup>	4'35±0'034 <sup>c</sup>	< 0'8	7'48±0'232 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

La pérdida de peso de los frutos fue progresiva, como se esperaba (Tabla X).

#### -Concentración de etanol en mesocarpio de frutos madurados a 12°C.

La concentración de etanol sólo fue detectable a partir del 11º DTR, 1 día antes de la completa maduración del fruto (Tabla XI). Después continuó incrementándose lentamente hasta iniciada la senescencia.

#### -Concentración de proteínas en mesocarpio de frutos madurados a 12°C

La concentración de proteínas registró un ligero incremento

Tabla XI. Concentración de etanol en mesocarpio de frutos madurados a 12°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	temprana
DTR	12°C
0	< 2'5
3	< 2'5
5	< 2'5
7	< 2'5
9	< 2'5
11	3'48 ± 0'166
13	4'2 ± 0'59
15	6'9 ± 0'58 <sup>c</sup>

-La concentración de etanol en mesocarpio está expresada en ng por g de mesocarpio.

-Los resultados representan la media aritmética de 6 medidas de un extracto conjunto de 6 frutos ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

desde la recolección hasta el 7º DTR (Tabla XII), 5 días antes de alcanzar la madurez (12º DTR). Comenzó a descender a partir de este momento.

#### **-Actividades enzimáticas en mesocarpio de frutos madurados a 12°C.**

Las actividades alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa evolucionaron de un modo similar a lo observado a 20°C, aunque con un retraso comparable al de otros parámetros de maduración (Tabla XIII).

La actividad fosfatasa ácida comenzó a aumentar durante la maduración hasta alcanzar un máximo el 11º DTR, 1 día antes de la maduración de los frutos (Tabla XIV). Después de esto comenzó a descender. La diferencia entre los valores máximo y mínimo registrados no alcanza el 80 % del mínimo.

Tabla XII. Concentración de proteínas en mesocarpio de frutos madurados a 12°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	temprana
DTR	12°C
0	5'19 ± 0'079
3	7'52 ± 0'038 <sup>c</sup>
5	6'75 ± 0'074 <sup>c</sup>
7	7'96 ± 0'041 <sup>c</sup>
9	7'07 ± 0'071 <sup>c</sup>
11	6'71 ± 0'083 <sup>c</sup>
13	6'66 ± 0'046 <sup>c</sup>
15	6'21 ± 0'071 <sup>c</sup>

-La concentración de proteínas está expresada en mg por gramo de tejido.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

La actividad amilasa fue en aumento a medida que progresaba la maduración hasta alcanzar un máximo el 11º DTR, cuando los frutos estaban recién maduros. Después comenzó a decrecer. La magnitud del máximo fue aproximadamente el doble de la existente el 1º DTR (Tabla XIV).

La actividad polifenol oxidasa mantuvo sus niveles durante los 5 primeros DTR. El 7º DTR había disminuído en un 40 % respecto del valor inicial y a partir de aquí y hasta el 15º DTR se mantuvo aproximadamente constante (Tabla XIV).

No se observó ningún descenso significativo en el nivel de actividad catalasa durante los diez primeros DTR, pero sí desde el día anterior a su madurez (11º DTR) y hasta la senectud (Tabla XIV).

#### -Observaciones de tipo organoléptico en frutos madurados a 12°C.

Los frutos incubados a 12°C alcanzaron la madurez el 12º DTR y

Tabla XIII. Actividades alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en mesocarpio de frutos madurados a 12°C.

Procedencia:		Jete		
Epoca:		tardía		
DTR	ALAT	ASAT	6-PGDH	G-6-PDH
1	8'0±0'77	8'2±0'43	1'52±0'083	1'42±0'075
5	6'5±1'25	9'8±0'73	1'68±0'116	1'48±0'090
7	6'6±1'30	9'1±0'89	1'57±0'180	1'63±0'152
9	4'8±0'43 <sup>b</sup>	9'2±0'53	1'79±0'090	1'67±0'063 <sup>a</sup>
10	4'3±0'49 <sup>b</sup>	8'1±0'73	1'84±0'162	1'61±0'102
11	3'03±0'116 <sup>c</sup>	8'4±0'47	1'95±0'049 <sup>b</sup>	1'72±0'031 <sup>b</sup>
12	2'7±0'46 <sup>c</sup>	8'0±0'84	1'65±0'108	1'44±0'061
13	3'2±0'48 <sup>c</sup>	9'3±1'03	1'60±0'139	1'40±0'087
15	3'05±0'292 <sup>c</sup>	8'9±0'47	1'39±0'120	1'12±0'107 <sup>a</sup>

-La actividad ALAT se expresa en  $\mu\text{mol (L-Ala)} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-La actividad ASAT se expresa en  $\mu\text{mol (L-Asp)} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-Las actividades 6-PGDH y G-6-PDH se expresan en  $\mu\text{mol NADP}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

continuaron en perfectas condiciones de consumo durante los días 13º y 14º. El pardeamiento de estos frutos comenzó en los bordes de los carpelos el 8º DTR, progresando a partir de entonces de modo muy lento; el 15º DTR, momento de inicio de la senescencia, el grado de pardeamiento alcanzado era considerablemente menor que en los frutos madurados a 20 o 23°C.

Se extrajeron 6 chirimoyas diariamente de la cámara de 12°C entre los días 5º al 13º y se incubaron a 23°C. En todos los casos los frutos completaron su maduración con normalidad en 1 a 3 días (dependiendo del grado de maduración alcanzado a 12°C).

Tabla XIV. Actividades fosfatasa ácida, amilasa, polifenol oxidasa y catalasa en mesocarpio de frutos madurados a 12°C.

Procedencia:		Jete		
Epoca:		tardía		
DTR	AcP	amilasa	PPO	catalasa
1	1'14±0'102	0'41±0'048	126±14'5	830±47
5	1'43±0'126	0'62±0'058 <sup>a</sup>	126±41	930±51
7	1'39±0'157	0'66±0'057 <sup>b</sup>	76±8'0 <sup>a</sup>	840±47
9	1'55±0'113 <sup>a</sup>	0'69±0'060 <sup>b</sup>	77±7'8 <sup>a</sup>	800±77
10	1'73±0'065 <sup>c</sup>	0'73±0'070 <sup>b</sup>	66±7'5 <sup>b</sup>	720±40
11	2'05±0'114 <sup>c</sup>	0'83±0'063 <sup>c</sup>	75±6'2 <sup>b</sup>	600±38 <sup>b</sup>
12	1'91±0'131 <sup>c</sup>	0'75±0'000 <sup>b</sup>	85±18'8	560±63 <sup>b</sup>
13	1'78±0'102 <sup>b</sup>	0'71±0'056 <sup>b</sup>	70±10'9 <sup>a</sup>	452±263 <sup>c</sup>
15	1'82±0'167 <sup>b</sup>	0'65±0'061 <sup>a</sup>	67±18'2 <sup>a</sup>	300±65 <sup>c</sup>

-La actividad AcP se expresa en  $\mu\text{mol p-NPP} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-La actividad amilasa se expresa en  $\mu\text{mol}$  maltosa equivalente  $\times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-La actividad PPO se expresa en unidades de absorbancia a 410 nm  $\times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-La actividad catalasa se expresa en  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

#### -Efecto del Ca sobre la conservación a 12°C.

Las chirimoyas fueron tratados con la disolución fungicida habitual que además contenía  $\text{CaCl}_2$  2 % (p/v) durante 5 minutos. Los frutos se refrigeraron a 12°C y se compararon con unos controles, no hallándose ningún efecto retardador del reblandecimiento o de la maduración en conjunto por parte del  $\text{CaCl}_2$ .

#### IV.3.3. REFRIGERACION A TEMPERATURA CONSTANTE: 10°C.

Una vez conocido el comportamiento de las chirimoyas cuando se refrigeran a 12°C se decidió estudiar la refrigeración a 10°C para intentar alargar el período de conservación que se consigue a 12°C. Se observó que esto es posible hacerlo en frutos recolectados en la

época media, pero no en los frutos de la época temprana, pues sufren daños por frío.

A continuación se exponen los resultados observados refrigerando los frutos a una temperatura constante de 10°C y humedad relativa de 90 ± 5 %.

**-Concentración tisular y producción de etileno en frutos madurados a 10°C.**

La concentración de etileno presente en el tejido de los frutos que maduraron a 10°C experimentó un incremento continuado desde el comienzo de su maduración hasta el 15º DTR, momento en el que el fruto ya había envejecido (Tabla XV). Los frutos recolectados en las temporadas media y tardía mostraron un comportamiento similar a pesar de que sólo los recolectados en la temporada media no sufrieron daños por frío al refrigerarlos a 10°C.

La producción de etileno se incrementó lentamente hasta el 5º DTR, tras lo cual disminuyó lentamente (Figura 2). La magnitud del máximo fue solamente de  $1'2 \pm 0'11 \mu\text{l etileno} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Esta baja velocidad de producción de etileno fue, sin embargo, suficiente para alcanzar elevados niveles tisulares.

**-Parámetros físicos y fisicoquímicos de maduración a 10°C.**

El contenido en sólidos solubles totales aumentó progresivamente durante la maduración incluso después de la aparición de los primeros síntomas de daños por frío (Tabla XVI). Los frutos recolectados en época media, que no sufrieron daños por frío, mostraron una evolución similar de este parámetro.

El pH del mesocarpio de los frutos refrigerados a 10°C (Tabla XVI) disminuyó durante la maduración. La velocidad de disminución de este parámetro en el caso de las chirimoyas recolectadas en época media, que no sufrieron daños por frío, fue más elevada que en los frutos tempranos, que sí experimentaron daños por frío. En frutos no dañados el pH alcanzó en 15 días valores de  $4'61 \pm 0'117$  y  $4'65 \pm 0'100$  en dos experimentos diferentes. Estos dos valores están dentro del intervalo de pH de los frutos maduros. Sin embargo, en el caso de los frutos que sufren daños por frío a esta temperatura (Tabla

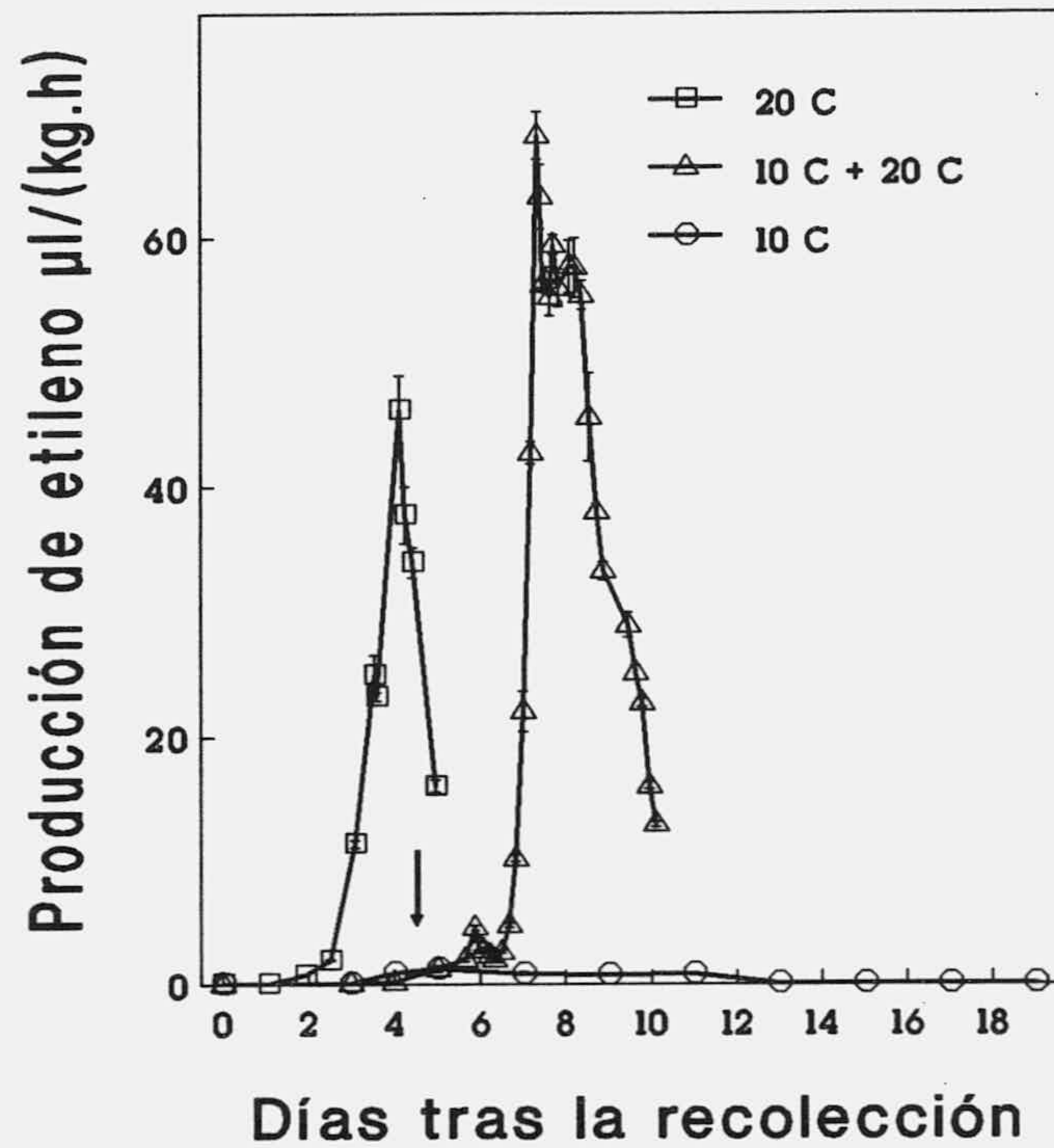


Figura 2. Producción de etileno en frutos incubados a 10 o 20°C. Las chirimoyas refrigeradas a 10°C fueron divididas en dos lotes, uno de los cuales se incubó después a 20°C (flecha) hasta el final del experimento. Los resultados son la media  $\pm$  S.E.M. de tres frutos individuales. Cada medida en un fruto es la media de tres determinaciones.

XVI), en 15 días el pH sólo bajó a 4'93.

La textura del mesocarpio disminuyó a un ritmo similar a lo largo de toda la temporada de recolección, independientemente de la aparición de daños por frío (Tabla XVI).

La pérdida de peso de los frutos, tal y como se esperaba, fue progresiva (Tabla XVI).



Tabla XV. Concentración de etileno tisular en chirimoyas maduras a 10°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	temprana
DTR	10°C
0	0'029 ± 0'0053
3	0'23 ± 0'064 <sup>a</sup>
5	0'49 ± 0'123 <sup>b</sup>
7	0'96 ± 0'241 <sup>b</sup>
9	2'0 ± 0'36 <sup>c</sup>
11	4'3 ± 0'63 <sup>c</sup>
13	23 ± 5'0 <sup>c</sup>
15	74 ± 12'9 <sup>c</sup>

-La concentración de etileno tisular se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

#### -Concentración de etanol en mesocarpio de frutos madurados a 10°C.

El valor de este parámetro se elevó a lo largo del tiempo de modo similar en frutos de las tres épocas de recolección procedentes de Motril y Jete (Tabla XVII).

#### -Concentración de proteínas en mesocarpio de frutos madurados a 10°C

La concentración de proteínas se elevó en los primeros DTR y, tras permanecer estable durante 5 días, descendió ligeramente (Tabla XVIII).

#### -Observaciones de tipo organoléptico en frutos refrigerados a 10°C.

Se incubaron a 10°C frutos procedentes de Motril y de Jete

Tabla XVI. Parámetros físicos y fisicoquímicos de maduración a 10°C.

Procedencia:		Motril		
Epoca:		temprana		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	8'07±0'251	6'10±0'132	100±4'0	0
3	11'86±0'240 <sup>c</sup>	6'18±0'084	79±4'8 <sup>b</sup>	3'23±0'100 <sup>c</sup>
5	13'97±0'140 <sup>c</sup>	6'10±0'098	71±9'3 <sup>a</sup>	5'42±0'246 <sup>c</sup>
7	17'4±0'58 <sup>c</sup>	5'88±0'076	59'5±2'16 <sup>c</sup>	7'9±0'44 <sup>c</sup>
9	19'3±0'70 <sup>c</sup>	5'5±0'55	43'0±2'71 <sup>c</sup>	8'63±0'283 <sup>c</sup>
11	19'5±0'31 <sup>c</sup>	5'26±0'043 <sup>c</sup>	40±4'2 <sup>c</sup>	12'9±0'76 <sup>c</sup>
13	21'7±0'76 <sup>c</sup>	5'07±0'043 <sup>c</sup>	8'1±2'79 <sup>c</sup>	13'4±0'52 <sup>c</sup>
15	22'7±0'55 <sup>c</sup>	4'93±0'081 <sup>c</sup>	3'8±0'31 <sup>c</sup>	14'5±0'30 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-Los datos de textura se expresan como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Tabla XVII. Concentración de etanol en mesocarpio de frutos madurados a 10°C.

Procedencia:		Motril
Epoca:		temprana
DTR		10°C
0		< 2'5
3		< 2'5
5		< 2'5
7		< 2'5
9		< 2'5
11		< 2'5
13		9'0 ± 0'74
15		52'9 ± 2'16 <sup>c</sup>

-La concentración de etanol en mesocarpio está expresada en ng por g de mesocarpio. Los resultados representan la media aritmética de 6 determinaciones en un extracto conjunto de 6 frutos ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Tabla XVIII. Concentración de proteínas en mesocarpio de frutos madurados a 10°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	temprana
DTR	10°C
0	5'19 ± 0'079
3	8'08 ± 0'097 <sup>c</sup>
5	7'33 ± 0'192 <sup>c</sup>
7	8'38 ± 0'033 <sup>c</sup>
9	6'31 ± 0'060 <sup>c</sup>
11	7'060 ± 0'0244 <sup>c</sup>
13	6'74 ± 0'076 <sup>c</sup>
15	6'44 ± 0'057 <sup>c</sup>

-La concentración de proteínas está expresada en mg de proteína por g de tejido

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es p < 0'05, <sup>b</sup> es p < 0'01 y <sup>c</sup> es p < 0'001.

recolectados en las épocas temprana y media. Los frutos se comportaron de modo diferente según la época de recolección. Las chirimoyas de la época temprana mostraron síntomas de daños por frío cuya severidad crecía a medida que la fecha de recolección se alejaba del invierno.

Los síntomas de daños por frío observados fueron los siguientes: picado del fruto o "bitter pit", que consiste en la aparición de pequeñas (menos de 1 mm de diámetro) depresiones de color pardo en la piel del fruto; pardeamiento precoz del epicarpio si atendemos a su grado de madurez; aparición de manchas pardas y grises en el mesocarpio y olor agrio anormal de la pulpa. En los frutos pueden aparecer uno o varios de estos síntomas. El momento de su aparición es muy variable: entre 5 y 15 días tras iniciar la refrigeración. Pueden hacerse visibles en la cámara frigorífica o después de la refrigeración, al ser incubados en condiciones normales.

Los frutos recolectados en la época media no mostraron síntomas de daños por frío. Maduraron con normalidad aunque de modo más lento que los refrigerados a 12°C, pues alcanzaron la madurez entre los

días 15º y 17º DTR.

#### **-Efecto del Ca sobre los daños por frío a 10°C.**

Las chirimoyas, recolectadas en la época temprana, fueron tratadas con la disolución fungicida habitual que además contenía  $\text{CaCl}_2$  2 % (p/v) durante 5 minutos. Los frutos fueron refrigerados a 10°C y comparados con unos controles, no hallándose ningún efecto protector del  $\text{CaCl}_2$  contra los daños por frío.

#### **IV.3.4. REFRIGERACION A 10°C, 9'5°C Y 9°C.**

Varios grupos de frutos recolectados en Motril y Jete a lo largo de la época media fueron refrigerados durante 15 días a 10°C, 9'5°C y 9°C. Después fueron incubados a 20°C durante 1 o 2 días para que completaran su maduración, lo que consiguieron de modo satisfactorio los frutos refrigerados a 10°C y más del 90 % de los refrigerados a 9'5°C. En la mayoría de los frutos refrigerados a 9°C y algunos de los refrigerados a 9'5°C se pudo observar un leve tono amarillento en el mesocarpio y un sabor y aroma notablemente menos intenso que en los frutos madurados en condiciones normales.

Algunos frutos continuaron bajo refrigeración después del 15º DTR. Completaron su maduración en cámara los frutos mantenidos a 10°C, pero aproximadamente 1/3 de los refrigerados a 9'5°C y casi todos los mantenidos a 9°C comenzaron a envejecer sin haber completado su maduración, es decir, antes de que se hubiese reblandecido por completo, la pulpa del fruto comenzó a amarillear y aparecieron sabores anormales.

#### **IV.3.5. REFRIGERACION A TEMPERATURA CONSTANTE: 4°C.**

Pocas horas después de la recolección de los frutos y tras el lavado y tratamiento fungicida habitual se refrigeraron a 4°C y 90 ± 5 % de humedad relativa y se mantuvieron en estas condiciones hasta el 11º DTR, momento en que fueron incubados a 20°C y 80 ± 10 % de humedad relativa. Anteriormente habíamos observado que la aparición de daños por frío dependía de la temperatura de refrigeración. Este

Tabla XIX. Actividades alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en mesocarpio de frutos refrigerados a 4°C hasta el 11º DTR e incubados después a 20°C.

Procedencia:	Jete			
Epoca:	tardía			
DTR	ALAT	ASAT	6-PGDH	G-6-PDH
1	8'0±0'77	8'2±0'43	1'52±0'083	1'42±0'075
6	8'9±0'70	10'5±0'52 <sup>b</sup>	1'51±0'122	1'53±0'125
11	7'2±0'67	7'9±0'39	1'46±0'119	1'49±0'122
.....				
15	5'4±1'21	8'5±0'62	1'52±0'045	1'07±0'086 <sup>a</sup>
17	1'05±0'099 <sup>c</sup>	6'15±0'299 <sup>b</sup>	1'72±0'097	0'87±0'120 <sup>b</sup>

-La actividad ALAT se expresa en  $\mu\text{mol (L-Ala) x min}^{-1} \text{ x g}^{-1}$  mesocarpio.  
 -La actividad ASAT se expresa en  $\mu\text{mol (L-Asp) x min}^{-1} \text{ x g}^{-1}$  mesocarpio.  
 -Las actividades 6-PGDH y G-6-PDH se expresan en  $\mu\text{mol NADP}^+ \text{ x min}^{-1} \text{ x g}^{-1}$  mesocarpio.  
 -Los datos que figuran por debajo de la línea de puntos corresponden a frutos que fueron incubados a 20°C desde el 11º DTR. Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

experimento se realizó para estudiar las características organolépticas y la evolución de determinadas actividades enzimáticas durante y tras la refrigeración de frutos sometidos a severos daños por frío.

**-Actividades enzimáticas en mesocarpio de frutos refrigerados a 4°C y después incubados a 20°C.**

La actividad alanina aminotransferasa se mantuvo constante durante la refrigeración a 4°C (hasta el 11º DTR). Cuando los frutos habían permanecido 6 días incubados a 20°C se observó que la actividad había disminuido ostensiblemente (Tabla XIX). La actividad aspartato aminotransferasa se elevó durante la refrigeración a 4°C (6º DTR) y después comenzó a disminuir lentamente, tanto durante la

Tabla XX. Actividades fosfatasa ácida, amilasa, polifenol oxidasa y catalasa en mesocarpio de frutos refrigerados a 4 °C hasta el 11º DTR e incubados después a 20°C.

Procedencia:		Jete		
Epoca:		tardía		
DTR	AcP	amilasa	PPO	catalasa
1	1'14±0'102	0'41±0'048	126±14'5	830±47
6	1'10±0'049	0'69±0'065 <sup>b</sup>	103±12'7	760±52
11	1'10±0'096	0'57±0'046 <sup>a</sup>	84±4'9 <sup>a</sup>	780±57
.....				
15	1'45±0'088 <sup>a</sup>	1'14±0'099 <sup>c</sup>	75±6'2 <sup>b</sup>	666±234 <sup>a</sup>
17	0'69±0'111 <sup>a</sup>	0'94±0'068 <sup>c</sup>	64±8'4 <sup>b</sup>	540±57 <sup>b</sup>

- La actividad AcP se expresa en  $\mu\text{mol p-NPP} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  de mesocarpio.
- La actividad amilasa se expresa en  $\mu\text{mol maltosa equivalente} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.
- La actividad PPO se expresa en unidades de absorbancia a 410 nm  $\times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.
- La actividad catalasa se expresa en  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  mesocarpio.
- Los datos que figuran por debajo de la línea de puntos corresponden a frutos que fueron incubados a 20°C desde el 11º DTR.
- Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

refrigeración como durante la incubación a 20°C. El día 17º DTR ya mostró una actividad menor que la inicial. (Tabla XIX).

La actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa no sufrió alteraciones significativas durante la refrigeración ni durante la incubación a 20°C (Tabla XIX). La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se mantuvo aproximadamente constante durante la refrigeración y disminuyó de modo significativo durante la incubación a 20°C (Tabla XIX).

La actividad fosfatasa ácida se mantuvo estable durante la refrigeración. Durante la incubación a 20°C mostró un incremento de su actividad seguido de una disminución hasta niveles inferiores a los iniciales (Tabla XX).

La actividad amilasa experimentó un suave incremento durante la refrigeración. Una vez incubados los frutos a 20°C experimentó una

brusca elevación para después comenzar a descender lentamente (Tabla XX).

La actividad polifenol oxidasa disminuyó paulatinamente durante la refrigeración y también durante la posterior incubación a 20°C (Tabla XX).

El nivel de actividad catalasa no cambió de modo significativo durante la refrigeración. Una vez iniciada la incubación comenzó a descender (Tabla XX).

#### **-Observaciones de tipo organoléptico en frutos refrigerados a 4°C y después incubados a 20°C.**

Al salir de la cámara el 11º DTR los frutos tenían el mismo aspecto que cuando se recolectaron. 6 días después de comenzar su incubación a 20°C los frutos mostraban síntomas de haber sufrido serios daños por frío: se habían reblandecido de modo irregular, el epicarpio estaba totalmente pardeado y en el mesocarpio aparecieron coloraciones violáceas anormales. Dos días más tarde también apareció un intenso y anormal olor agrio en la pulpa.

#### **IV.3.6. REFRIGERACION A 4°C SEGUIDA DE INCUBACION A 20°C CON ETILENO.**

Los datos del apartado anterior muestran que los síntomas macroscópicos de los daños por frío aparecen durante la incubación a 20°C. El experimento que se describe a continuación se realizó con el objeto de averiguar si el etileno aplicado inmediatamente después del final de la refrigeración puede proteger a las chirimoyas frente a la aparición de daños por frío.

Los frutos, recolectados en Motril en la época media, se refrigeraron a  $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y  $90 \pm 5\%$  de humedad relativa durante 7 días. Después se retiraron de la cámara y se dividieron en grupos que recibieron tratamientos diferentes:

Tratamiento 1: 4 días a 20°C.

Tratamiento 2: 8 horas a 20°C en atmósfera con 1.000 ppm  $\text{C}_2\text{H}_4$ .

Tratamiento 3: 24 horas a 20°C en atmósfera con 1.000 ppm  $\text{C}_2\text{H}_4$ .

Tratamiento 4: baño en agua con 1.500 ppm de Ethephón (Ethrel 48 %

al 0'3 %) y Deccosol C al 0'2 %.

A la salida de la cámara todos los frutos tenían un aspecto similar al que presentaban el día en que fueron recolectados. Al terminar los 4 días de incubación a 20°C, las chirimoyas de los cuatro tratamientos presentaban severos daños por frío. La única diferencia apreciada consistió en que los frutos que habían sido incubados con etileno (tratamientos 2 y 3) se habían reblandecido apreciablemente más que los otros.

#### IV.3.7. CONSERVACION A TEMPERATURAS CAMBIANTES.

Una vez que se hubo comprobado que la temperatura mínima que posibilitaba la conservación de los frutos sin la aparición de daños por frío era de 12°C y que la refrigeración a esta temperatura sólo permitía conservar los mismos durante un máximo de 12 a 14 días, se decidió abordar el problema de la conservación desde un nuevo enfoque. Este, en líneas generales, consistió en mantener los frutos a temperaturas iguales o superiores a 12°C para permitir el inicio de la maduración y su progreso hasta un grado próximo al de consumo, momento en que los frutos fueron refrigerados a 1 o 4°C, temperaturas que en frutos recién recolectados habrían producido severos daños por frío.

##### IV.3.7.1. PREMADURACION A 23°C SEGUIDA DE REFRIGERACION A 1 Y 4°C.

Los frutos se recolectaron en la época media en la zona de Jete. Se dividieron en grupos, 4 de los cuales siguieron los tratamientos de lavado y antifúngicos habituales (III.2.1.1. y III.2.1.2.) y el 5º fue tratado con la misma disolución fungicida a la que se adicionó Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 0'5 % (p/v).

Los tratamientos térmicos a que se sometieron los frutos fueron los siguientes:

- Tratamiento 3D23/1°C: 3 días a 23°C y 80 ± 10 % de humedad relativa, tras lo cual se analizaron 6 frutos y el resto se refrigeró a 1°C y 90 ± 5 % de humedad relativa.
- Tratamiento 3D23/4°C: 3 días a 23°C y 80 ± 10 % de humedad relativa, tras lo cual se refrigeraron a 4°C y 90 ± 5 % de humedad



relativa.

- Tratamiento 4D23/1°C: 4 días a 23°C y  $80 \pm 10$  % de humedad relativa, tras lo cual se refrigeraron a 1°C y  $90 \pm 5$  % de humedad relativa.
- Tratamiento 4D23/4°C: 4 días a 23°C y  $80 \pm 10$  % de humedad relativa, tras lo cual se refrigeraron a 4°C y  $90 \pm 5$  % de humedad relativa.
- Tratamiento 3D23/1°C/sulfito: 3 días a 23°C y  $80 \pm 10$  % de humedad relativa, tras lo cual se refrigeraron a 1°C y  $90 \pm 5$  % de humedad relativa. Estos frutos fueron tratados con la disolución de sulfito sódico antes descrita.

**-Concentración tisular de etileno en frutos premadurados a 23°C y refrigerados a 1 y 4°C.**

La concentración de etileno presente en el tejido de los frutos que maduraban a 23°C experimentó un gran descenso al refrigerar los frutos (Tabla XXI). La disminución de este parámetro continuó a partir del 9º DTR.

La concentración de etileno disminuyó en todos los tratamientos al iniciar la refrigeración, pero el 9º DTR los frutos de los dos tratamientos refrigerados a 1°C mantuvieron niveles significativamente más bajos que los refrigerados a 4°C. El 21º DTR las diferencias se habían reducido notablemente.

**-Parámetros físicos y fisicoquímicos en la premaduración a 23°C y refrigeración a 1 y 4°C.**

El contenido en sólidos solubles totales aumentó rápidamente en los primeros días de la maduración (Tabla XXII). El valor de este parámetro no continuó incrementándose de modo significativo durante la refrigeración de los frutos, pero esto no debe atribuirse a la refrigeración sino a que el 3º DTR los SST ya habían alcanzado su valor máximo.

El pH del mesocarpio de los frutos sufrió una rápida caída desde el comienzo de la maduración, alcanzando ya el 3º DTR un valor comprendido dentro del rango de valores que presentan los frutos plenamente maduros (apartado IV.2. y Tabla XXIII). En días posteriores el pH permaneció prácticamente constante tanto en los frutos

Tabla XXI. Concentración de etileno tisular en chirimoyas premaduras a 23°C y refrigeradas a 1°C y 4°C.

Procedencia:		Jete			
Epoca:		media			
DTR	3D23/1°C	3D23/4°C	4D23/1°C	4D23/4°C	
0	0'078±0'0071	=	=	=	
3	1'5±1'00 <sup>c</sup>	=	=	=	
4	-	-	4'18±0'073 <sup>c</sup>	=	
9	0'25±0'051 <sup>b</sup>	0'86±0'094 <sup>c</sup>	0'41±0'053 <sup>c</sup>	1'87±0'228 <sup>c</sup>	
21	0'167±0'0263 <sup>b</sup>	0'53±0'099 <sup>b</sup>	0'32±0'070 <sup>b</sup>	0'44±0'075 <sup>c</sup>	
28	0'165±0'0190 <sup>c</sup>	-	-	-	

-La concentración de etileno tisular se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.  
 -El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es p < 0'01 y <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XXII. Sólidos solubles totales en mesocarpio de chirimoyas premaduras a 23°C y refrigeradas a 1°C y 4°C.

Procedencia:		Jete			
Epoca:		media			
DTR	3D23/1°C	3D23/4°C	4D23/1°C	4D23/4°C	
0	8'91±0'270	=	=	=	
3	23'2±0'42 <sup>c</sup>	=	=	=	
4	-	-	23'8±0'41 <sup>c</sup>	=	
9	22'1±0'65 <sup>c</sup>	23'674±0'0243 <sup>c</sup>	22'8±0'53 <sup>c</sup>	20'9±0'78 <sup>c</sup>	
21	22'7±0'67 <sup>c</sup>	23'8±0'63 <sup>c</sup>	23'3±0'70 <sup>c</sup>	22'5±0'43 <sup>c</sup>	
28	23'23±0'199 <sup>c</sup>	-	-	-	

-El contenido en sólidos solubles totales se expresa en °Brix.  
 -El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XXIII. pH del mesocarpio de chirimoyas premaduras a 23°C y refrigeradas a 1°C y 4°C.

Procedencia:		Jete		
Epoca:		media		
DTR	3D23/1°C	3D23/4°C	4D23/1°C	4D23/4°C
0	6'30±0'272	=	=	=
3	4'35±0'052 <sup>c</sup>	=	=	=
4	-	-	4'372±0'0264 <sup>c</sup>	=
9	4'44±0'034 <sup>c</sup>	4'40±0'285 <sup>c</sup>	4'344±0'0291 <sup>c</sup>	4'37±0'035 <sup>c</sup>
21	4'447±0'0241 <sup>c</sup>	4'328±0'0159 <sup>c</sup>	4'218±0'0217 <sup>c</sup>	4'21±0'032 <sup>c</sup>
28	4'37±0'042 <sup>c</sup>	-	-	-

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

que permanecieron un día más a 23°C como en los refrigerados.

La textura del mesocarpio, además de la disminución observada durante la maduración a 23°C, continuó disminuyendo una vez iniciada la refrigeración de los frutos independientemente de la temperatura de refrigeración (Tabla XXIV).

La pérdida de peso de los frutos continuó disminuyendo con la refrigeración aunque más lentamente que en la premaduración, siendo mayor a 4°C que a 1°C (Tabla XXV).

**-Observaciones de tipo organoléptico en frutos premadurados a 23°C y refrigerados a 1 y 4°C.**

Los frutos incubados a 23°C llegaron a la madurez el 30 DTR, alcanzando sus características organolépticas máximas el 40 DTR, momento en que se inició el pardeamiento de los carpelos en sus bordes.

El 90 DTR los frutos de todos los tratamientos se encontraban maduros para el consumo, siendo su sabor y aroma excelente. El epicarpio de los frutos tenía el mismo aspecto que cuando se inició

Tabla XXIV. Textura del mesocarpio de chirimoyas premaduras a 23°C y refrigeradas a 1°C y 4°C.

Procedencia:		Jete			
Epoca:		media			
DTR	3D23/1°C	3D23/4°C	4D23/1°C	4D23/4°C	
0	87±5'2	=	=	=	
3	2'91±0'186 <sup>c</sup>	=	=	=	
4	-	-	1'79±0'138 <sup>c</sup>	=	
9	1'7±0'00 <sup>c</sup>	1'7±0'00 <sup>c</sup>	< 0'8	< 0'8	
21	< 0'8	< 0'8	< 0'8	< 0'8	
28	< 0'8	-	-	-	

-La textura se expresan como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomado como referencia.

-El signo "-" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XXV. Porcentaje de pérdida de peso en frutos premadurados a 23°C y 80 % de humedad relativa y refrigerados a 1 y 4°C y 90 % de humedad relativa.

Procedencia:		Jete			
Epoca:		media			
DTR	3D23/1°C	3D23/4°C	4D23/1°C	4D23/4°C	
0	0	0	0	0	
3	4'17±0'278 <sup>c</sup>	=	=	=	
4	-	-	6'09±0'206 <sup>c</sup>	=	
9	5'2±0'50 <sup>c</sup>	5'80±0'227 <sup>c</sup>	7'9±0'32 <sup>c</sup>	8'4±0'74 <sup>c</sup>	
21	7'3±0'38 <sup>c</sup>	11'2±0'45 <sup>c</sup>	9'8±0'37 <sup>c</sup>	14'1±0'43 <sup>c</sup>	
28	8'0±0'55 <sup>c</sup>	-	-	-	

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-El signo "-" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

la refrigeración.

El 21º DTR las diferencias entre tratamientos se habían agrandado: los frutos del tratamiento 3D23/1°C mostraban un epicarpio de color verde sin pardear y con buen aspecto. La pulpa tenía buen sabor y aspecto, aunque se observó la aparición de una pequeña (1-2 mm de grosor) zona del mesocarpio de color rosado contigua al punto de unión al pedúnculo. Los frutos del tratamiento 4D23/1°C tenían una pulpa plenamente apta para el consumo, pero su epicarpio presentaba un aspecto mustio que comprometía su valor comercial. Todos los frutos refrigerados a 4°C mostraban claros signos de envejecimiento.

El 28º DTR los frutos del tratamiento 3D23/1°C seguían siendo aptos para el consumo pero el epicarpio ya aparecía algo mustio. El resto de los frutos estaban notablemente más envejecidos.

En resumen, puede decirse que los frutos refrigerados a 1°C estaban en mejores condiciones que los mantenidos a 4°C. Los refrigerados en el primer día de su madurez (3 días a 23°C) se conservaron mejor que los refrigerados más tarde (4 días a 23°C).

**-Utilidad del sulfito sódico como agente inhibidor del pardeamiento en frutos premadurados y posteriormente refrigerados.**

Los frutos tratados con sulfito sódico no mostraron diferencias con respecto a los no tratados. Por consiguiente, el sulfito sódico no parece que sea útil como agente inhibidor del pardeamiento.

**IV.3.7.2. PREMADURACION A 20°C SEGUIDA DE REFRIGERACION A 1 Y 4°C.**

Se hicieron varios experimentos de premaduración y refrigeración a 1 o 4°C con frutos procedentes de Motril y Jete recolectados en las épocas temprana y media. A continuación se muestran los datos de un experimento tipo. Los frutos recién recolectados se incubaron a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  con una humedad relativa de  $80 \pm 10\%$  y se refrigeraron a  $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (humedad relativa de  $90 \pm 5\%$ ) después de 4 (4D20/4°C) o 5 (5D20/4°C) días.

Tabla XXVI. Concentración de etileno tisular en chirimoyas premaduradas a 20°C y refrigeradas a 4°C.

Procedencia:	Jete	
Epoca:	media	
DTR	4D20/4°C	5D20/4°C
0	0'048 ± 0'0096	=
4	14'1 ± 2'82 <sup>c</sup>	=
5	-	20'6 ± 0'83 <sup>c</sup>
15	1'87 ± 0'160 <sup>c</sup>	1'63 ± 0'217 <sup>c</sup>
23	0'75 ± 0'107 <sup>c</sup>	0'88 ± 0'084 <sup>c</sup>
29	0'82 ± 0'226 <sup>b</sup>	0'88 ± 0'084 <sup>c</sup>

-La concentración de etileno tisular se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

#### -Concentración tisular de etileno en frutos premadurados a 20°C y refrigerados a 4°C.

La concentración de etileno presente en el tejido de los frutos que maduraban a 20°C experimentó una gran disminución al refrigerarlos (Tabla XXVI), de modo similar a lo sucedido al refrigerar frutos premadurados a 23°C. Este parámetro continuó disminuyendo hasta el 23º DTR. Los niveles de etileno tisular evolucionaron de modo similar en ambos tratamientos.

#### -Parámetros físicos y fisicoquímicos en frutos premadurados a 20°C y refrigerados a 1 y 4°C.

El contenido en sólidos solubles totales aumentó rápidamente durante la premaduración, habiendo alcanzado ya su valor máximo cuando comenzó la refrigeración. A lo largo de este período permaneció estable (Tablas XXVII y XXVIII).

Tabla XXVII. Parámetros físicos y fisicoquímicos de chirimoyas premaduradas a 20°C durante 4 días y refrigeradas a 4°C.

Procedencia:		Jete		
Epoca:		media		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	9'2±0'36	6'02±0'238	97±5'2	0
4	22'06±0'218 <sup>c</sup>	4'43±0'038 <sup>c</sup>	3'30±0'214 <sup>c</sup>	4'87±0'139 <sup>c</sup>
15	21'29±0'267 <sup>c</sup>	4'32±0'033 <sup>c</sup>	1'72±0'000 <sup>c</sup>	10'9±0'36 <sup>c</sup>
23	20'43±0'261 <sup>c</sup>	4'37±0'049 <sup>c</sup>	< 0'8	14'1±0'56 <sup>c</sup>
29	21'92±0'288 <sup>c</sup>	4'49±0'037 <sup>c</sup>	< 0'8	17'4±0'61 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio. No se ha hecho estudio estadístico de estos datos.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Los frutos se refrigeraron cuando el pH ya había alcanzado niveles correspondientes a frutos maduros, permaneciendo prácticamente estable durante todo el período de refrigeración (Tablas XXVII y XXVIII).

La textura del mesocarpio no había alcanzado su nivel mínimo durante la premaduración y continuó cayendo durante el período de refrigeración (Tablas XXVII y XXVIII).

La pérdida de peso de los frutos fue notablemente más rápida durante la premaduración que durante la refrigeración (Tablas XXVII y XXVIII). Aún así, ésta continuó a un ritmo nada despreciable, habiéndose perdido un 14 o 15 % del peso en ambos tratamientos el 23º DTR.

Tabla XXVIII. Parámetros físicos y fisicoquímicos de chirimoyas premaduras a 20°C durante 5 días y refrigeradas a 4°C.

Procedencia:		Jete		
Epoca:		media		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	9'2±0'36	6'02±0'238	97±5'2	0
4	22'06±0'218 <sup>c</sup>	4'43±0'038 <sup>c</sup>	3'30±0'214 <sup>c</sup>	4'87±0'139 <sup>c</sup>
5	22'4±0'60 <sup>c</sup>	4'38±0'042 <sup>c</sup>	2'9±0'46 <sup>c</sup>	7'90±0'261 <sup>c</sup>
15	21'5±0'55 <sup>c</sup>	4'26±0'030 <sup>c</sup>	1'18±0'070 <sup>c</sup>	12'8±0'38 <sup>c</sup>
23	21'8±0'39 <sup>c</sup>	4'23±0'035 <sup>c</sup>	< 0'8	15'0±0'46 <sup>c</sup>
29	22'13±0'313 <sup>c</sup>	4'327±0'0173 <sup>c</sup>	< 0'8	18'0±0'48 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio. No se ha hecho estudio estadístico de estos datos.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

#### -Observaciones de tipo organoléptico en frutos premadurados a 20°C y refrigerados a 1 y 4°C.

Los mejores resultados se han obtenido con frutos refrigerados inmediatamente después de haber alcanzado la madurez. Los frutos refrigerados a 1°C recién maduros mantuvieron su pulpa con un sabor excelente hasta el 23º DTR y el pardeamiento del epicarpio no progresó más allá de los bordes de algunos carpelos. Los frutos continuaban siendo aptos para el consumo durante 1 a 1'5 días después de salir de la cámara frigorífica.

Los frutos refrigerados cuando ya estaban plenamente maduros mostraron un epicarpio siempre algo más pardeado y un mesocarpio senescente el 15º DTR. En los frutos refrigerados un día antes de llegar a la madurez era frecuente la aparición de daños.

Los frutos refrigerados a 1°C se mostraron algo mejor conservados que los refrigerados a 4°C: en estos últimos el pardeamiento



del epicarpio comenzaba unos 4-5 días antes durante la refrigeración. Una vez que se interrumpía la refrigeración y se trasladaban a temperatura ambiente, la pulpa de las chirimoyas refrigeradas a 1°C senescía después que la refrigerada a 4°C.

Sin embargo, los buenos resultados obtenidos en las condiciones arriba citadas no siempre han sido reproducibles, pues ha habido lotes completos de frutos conservados satisfactoriamente mientras que otros de la misma procedencia y recolectados en la misma época han sufrido daños con este procedimiento. Esta diversidad de comportamiento se ha observado en frutos de las épocas temprana y media procedentes de Motril y Jete.

Los datos analíticos mostrados en las tablas XXVI y XXVII corresponden a frutos que respondieron de modo óptimo al tratamiento de conservación. Sin embargo, otros lotes de frutos sometidos al mismo tratamiento y que, a juzgar por sus características organolépticas, no se conservaron adecuadamente, mostraron el mismo comportamiento en sus parámetros analíticos.

#### **IV.3.7.3. PREMADURACION A 12°C SEGUIDA DE REFRIGERACION A 1 Y 4°C.**

En experimentos anteriores se había conseguido una satisfactoria conservación de los frutos premadurándolos en condiciones normales durante 3 o 4 días y refrigerándolos a 1 o 4°C durante 17 o 18 días más.

En los experimentos descritos a continuación se sometió a los frutos a tratamientos que consistían en alargar el período de premaduración a unos 12 días mediante la refrigeración a 12°C y refrigerar a 1 o 4°C a continuación. De este modo se pretendía, por una parte, alargar el estrecho intervalo de tiempo en el que los frutos premadurados a 20 o 23°C podían ser refrigerados a baja temperatura con éxito. También se pretendía estudiar la posibilidad de que al período de premaduración a 12°C se le pudiese sumar un período de refrigeración a 1 o 4°C similar al observado en frutos premadurados en condiciones normales (17 o 18 días), lográndose un tiempo de conservación en torno a 30 días.

Los tratamientos aplicados a los frutos fueron los siguientes:

Tabla XXIX. Concentración de etileno tisular en chirimoyas premaduradas a 12°C y refrigeradas a 1°C.

Procedencia:	Jete				
Epoca:	tardía				
DTR	9D12/1°C	10D12/1°C	11D12/1°C	12D12/1°C	13D12/1°C
2	0'132±0'0185	=	=	=	=
9	8'6±0'87 <sup>c</sup>	=	=	=	=
10		10'8±1'10 <sup>c</sup>	=	=	=
11			15'7±1'32 <sup>c</sup>	=	=
12				25±4'6 <sup>c</sup>	=
13					44±5'2 <sup>c</sup>
21	0'170±0'0184	0'196±0'0120 <sup>a</sup>	0'186±0'0215	0'213±0'0138 <sup>b</sup>	0'239±0'0144 <sup>b</sup>

-La concentración de etileno tisular se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.  
 -El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es p < 0'05, <sup>b</sup> es p < 0'01 y <sup>c</sup> es p < 0'001.

tras iniciar la refrigeración a 12 ± 0'5°C (humedad relativa de 85 ± 5 %), distintos grupos de frutos fueron trasladados a 1 o 4 ± 0'5°C (humedad relativa de 90 ± 5 %) en los días próximos a su maduración, siendo estudiado su estado unos días más tarde. El tratamiento aplicado a cada grupo de frutos se expresa en su denominación del modo habitual.

**-Concentración tisular de etileno en frutos premadurados a 12°C y refrigerados a 1°C.**

La concentración de etileno tisular ascendió continuamente durante la premaduración a 12°C (Tabla XXIX). El 21º DTR, sin embargo, los niveles de etileno habían descendido a valores próximos a los iniciales.

Tabla XXX. Sólidos solubles totales en mesocarpio de chirimoyas premaduras a 12°C y refrigeradas a 1°C.

Procedencia:	Jete				
Epoca:	tardía				
DTR	9D12/1°C	10D12/1°C	11D12/1°C	12D12/1°C	13D12/1°C
2	13'3±0'83	=	=	=	=
9	23'94±0'275 <sup>c</sup>	=	=	=	=
10		24'4±0'66 <sup>c</sup>	=	=	=
11			24'5±0'69 <sup>c</sup>	=	=
12				25'6±0'53 <sup>c</sup>	=
13					26'2±0'31 <sup>c</sup>
21	23'8±0'26 <sup>c</sup>	24'0±0'57 <sup>c</sup>	25'73±0'173 <sup>c</sup>	25'4±0'41 <sup>c</sup>	25'8±0'37 <sup>c</sup>

-El contenido en sólidos solubles totales se expresa en °Brix.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

**-Parámetros físicos y fisicoquímicos en la premaduración a 12°C y refrigeración a 1 y 4°C.**

El contenido en sólidos solubles totales que tenían los frutos cuando se inició la refrigeración no osciló de modo significativo durante la misma, ya se hubiese alcanzado o no el máximo (Tablas XXX y XXXI). En estas tablas se pueden observar que los valores máximos de SST alcanzados por los frutos de época temprana son distintos a los alcanzados en época tardía. Sin embargo, su patrón de maduración es el mismo.

El pH del mesocarpio de los frutos disminuyó rápidamente durante la premaduración. Durante la refrigeración permaneció estable en los frutos que se refrigeraron ya maduros y disminuyó lentamente en los frutos refrigerados aún no maduros (Tabla XXXI).

Después de iniciada la refrigeración, la textura de los frutos continuó disminuyendo aunque muy lentamente (Tabla XXXII).

La pérdida de peso diaria de los frutos fue más rápida durante la premaduración que durante la refrigeración (Tabla XXXIII).

Tabla XXXI. pH del mesocarpio de frutos premadurados a 12°C y refrigerados a 1°C.

Procedencia:		Jete				
Epoca:		tardía				
DTR	9D12/1°C	10D12/1°C	11D12/1°C	12D12/1°C	13D12/1°C	
2	5'66±0'65	=	=	=	=	
9	4'7±0'50 <sup>c</sup>	=	=	=	=	
10		4'797±0'0277 <sup>c</sup>	=	=	=	
11			4'678±0'065 <sup>c</sup>	=	=	
12				4'49±0'029 <sup>c</sup>	=	
13					4'48±0'034 <sup>c</sup>	
21	4'87±0'066 <sup>c</sup>	4'592±0'0139 <sup>c</sup>	4'492±0'0053 <sup>c</sup>	4'43±0'0126 <sup>c</sup>	4'45±0'0253 <sup>c</sup>	

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XXXII. Textura del mesocarpio de frutos premadurados a 12°C y refrigerados a 1°C.

Procedencia:		Jete				
Epoca:		tardía				
DTR	9D12/1°C	10D12/1°C	11D12/1°C	12D12/1°C	13D12/1°C	
2	108±5'5	=	=	=	=	
9	5'4±0'55 <sup>c</sup>	=	=	=	=	
10		4'2±0'49 <sup>c</sup>	=	=	=	
11			4'1±0'49 <sup>c</sup>	=	=	
12				1'9±0'41 <sup>c</sup>	=	
13					1'11±0'174 <sup>c</sup>	
21	4'2±0'66 <sup>c</sup>	2'5±0'53 <sup>c</sup>	1'25±0'00 <sup>c</sup>	< 0'8	< 0'8	

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XXXIII. Porcentaje de pérdida de peso en frutos premadurados a 12°C y 85 % de humedad relativa y refrigerados a 1°C y 90 % de humedad relativa.

Procedencia:	Jete				
Epoca:	tardía				
DTR	9D12/1°C	10D12/1°C	11D12/1°C	12D12/1°C	13D12/1°C
2	0	=	=	=	=
9	4'3±0'58 <sup>c</sup>	=	=	=	=
10		5'5±0'34 <sup>c</sup>	=	=	=
11			6'4±0'35 <sup>c</sup>	=	=
12				7'1±0'43 <sup>c</sup>	=
13					7'9±0'46 <sup>c</sup>
21	7'69±0'246 <sup>c</sup>	7'9±0'78 <sup>c</sup>	7'88±0'145 <sup>c</sup>	8'0±0'41 <sup>c</sup>	8'2±0'34 <sup>c</sup>

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Los frutos premadurados a 12°C y refrigerados a 4°C se recolectaron en la época temprana. El valor máximo alcanzado por los sólidos solubles totales (Tabla XXXIV) es inferior al logrado en frutos de época tardía refrigerados a 1°C (Tabla XXX), pero el patrón de comportamiento es el mismo. El pH evolucionó de modo similar en ambos casos (Tablas XXXV y XXXI).

**-Observaciones de tipo organoléptico en frutos premadurados a 12°C y refrigerados a 1 y 4°C.**

Los frutos premadurados a 12°C y refrigerados a 4°C estaban deteriorados el 15º DTR. El tipo de daños sufridos dependía del grado de madurez alcanzado en el momento de la refrigeración: los refrigerados cuando aún no estaban maduros mostraron daños por frío, mientras que los refrigerados maduros se hallaban en plena senescencia.

Los frutos refrigerados a 1°C con 10 días de premaduración

Tabla XXXIV. Sólidos solubles totales en mesocarpio de chirimoyas premaduradas a 12°C y refrigeradas a 4°C.

Procedencia:		Motril				
Epoca:		temprana				
DTR	8D12/4°C	9D12/4°C	10D12/4°C	11D12/4°C	12D12/4°C	
0	6'5±0'164	=	=	=	=	
8	18'0±0'34 <sup>c</sup>	=	=	=	=	
9		19'7±0'34 <sup>c</sup>	=	=	=	
10			20'6±0'21 <sup>c</sup>	=	=	
11				20'3±0'78 <sup>c</sup>	=	
12					19'4±0'70 <sup>c</sup>	
15	18'8±0'39 <sup>c</sup>	20'4±0'52 <sup>c</sup>	21'0±0'35 <sup>c</sup>	20'9±0'58 <sup>c</sup>	20'8±0'31 <sup>c</sup>	

-El contenido en sólidos solubles totales se expresa en °Brix.  
 -El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XXXV. pH del mesocarpio de frutos premadurados a 12°C y refrigerados a 4°C.

Procedencia:		Motril				
Epoca:		temprana				
DTR	8D12/4°C	9D12/4°C	10D12/4°C	11D12/4°C	12D12/4°C	
0	6'202±0'070	=	=	=	=	
8	4'93±0'041 <sup>c</sup>	=	=	=	=	
9		4'84±0'026 <sup>c</sup>	=	=	=	
10			4'78±0'034 <sup>c</sup>	=	=	
11				4'673±0'0204 <sup>c</sup>	=	
12				4'661±0'0259 <sup>c</sup>	=	
15	4'735±0'0218 <sup>c</sup>	4'80±0'066 <sup>c</sup>	4'66±0'043 <sup>c</sup>	4'52±0'058 <sup>c</sup>	4'503±0'0186 <sup>c</sup>	

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

tenían un aspecto y sabor excelentes el 21º DTR. Sin embargo, los premadurados menos tiempo sufrieron daños por frío y los premadurados más tiempo estaban senescentes el 21º DTR. Al repetir este experimento varias veces se observó que en unas ocasiones los frutos se comportaron como se ha descrito y en otras no se conservó satisfactoriamente ningún grupo de frutos. No se halló ninguna correlación entre la época o la zona de recolección y el resultado positivo o negativo de cada experimento.

#### **IV.3.7.4. REFRIGERACION INTERMITENTE A 8'5°C.**

En algunas lonjas del litoral granadino disponen de cámaras frigoríficas a una temperatura de 8'5°C para conservar aguacates. Se pensó en la posibilidad de aprovechar los espacios vacíos de estas cámaras para conseguir algún retraso en la maduración de las chirimoyas. Como sucede que el volumen de frutos durante la campaña de recolección suele rebasar holgadamente la capacidad de estas cámaras, la refrigeración se realizaría durante cortos períodos de tiempo (12 a 36 horas) y de modo intermitente. Los ciclos de refrigeración y exposición a temperatura ambiente serían, en la práctica, sumamente flexibles y se establecerían en función de las necesidades diarias. Con el siguiente experimento se ha estudiado la posible utilidad de un procedimiento que para su puesta en práctica necesita que se muevan diariamente muchas toneladas de fruta hacia dentro y fuera de las cámaras.

#### **-Tratamiento térmico de los frutos en la refrigeración intermitente a 8'5°C.**

Los frutos utilizados en este experimento se recolectaron en Motril en la época temprana. Fueron divididos en 5 grupos y se sometieron alternativamente a dos condiciones (8'5 ± 0'5°C y 90 ± 5 % de humedad relativa, y 23 ± 1°C y 80 ± 10 % de humedad relativa) del modo que se indica a continuación.

-Controles: 23°C hasta su maduración.

-Tratamiento 1: 9 horas a 8'5°C y 23°C hasta su maduración.

-Tratamiento 2: 5 horas a 8'5°C, 3 horas a 23°C, 10 horas a 8'5°C y 23°C hasta su maduración (en total, 15 horas de refrigeración).

-Tratamiento 3: 5 horas a 8'5°C, 3 horas a 23°C, 10 horas a 8'5°C, 3 horas a 23°C, 8 horas a 8'5°C y 23°C hasta su maduración (en

total, 23 horas de refrigeración).

-Tratamiento 4: 5 horas a 8'5°C, 3 horas a 23°C, 10 horas a 8'5°C, 3 horas a 23°C, 25 horas a 8'5°C y 23°C hasta su maduración (en total, 40 horas de refrigeración).

**-Parámetros físicos y fisicoquímicos en la refrigeración intermitente a 8'5°C.**

Se han estudiado tres parámetros de maduración en los tiempos 0, 4 y 5 DTR: contenido en SST (Tabla XXXVI), pH del mesocarpio (Tabla XXXVII) y textura (XXXVIII). No se observaron diferencias con respecto a los controles en los tratamientos 1 y 2, mientras que los 3 y 4 producen una ligera disminución en la velocidad de maduración, siendo ésta más lenta a medida que se prolonga el tiempo total de refrigeración, a pesar de que ésta se haga de modo intermitente. Los frutos del tratamiento 4 tenían menor contenido en SST, mayor valor de pH y mayor textura que los controles tanto el 4º como el 5º DTR, diferencias que son estadísticamente significativas.

Tabla XXXVI. Sólidos solubles totales en mesocarpio de frutos refrigerados a 8'5°C de modo intermitente.

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
DTR	Control	trat. 1	trat. 2	trat. 3	trat. 4
0	6'50±0'164	=	=	=	=
4	22'9±0'79	23'0±0'70	22'1±0'79	20'6±0'58 <sup>a</sup>	18'4±0'18 <sup>c</sup>
5	22'9±0'18	22'7±0'6	22'8±0'18	22'4±0'69	20'8±0'74 <sup>a</sup>

-El contenido en sólidos solubles totales se expresa en °Brix.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto al valor de la izquierda de la fila tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .



Tabla XXXVII. pH del mesocarpio de frutos refrigerados a 8'5°C de modo intermitente.

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
DTR	Control	trat. 1	trat. 2	trat. 3	trat. 4
0	6'202±0'070	=	=	=	=
4	4'55±0'04	4'62±0'08	4'64±0'07	4'83±0'14	5'28±0'14 <sup>c</sup>
5	4'47±0'02	4'48±0'04	4'47±0'02	4'57±0'02 <sup>b</sup>	4'69±0'02 <sup>c</sup>

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto al valor de la izquierda de la fila tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es p < 0'01 y <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XXXVIII. Textura del mesocarpio de frutos refrigerados a 8'5°C de modo intermitente.

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
DTR	Control	trat. 1	trat. 2	trat. 3	trat. 4
0	100±6'2	=	=	=	=
4	1'83±0'166	1'91±0'249	2'01±0'299	3'0±0'42	5'5±1'13 <sup>c</sup>
5	< 0'8	< 0'8	< 0'8	1'68±0'083 <sup>b</sup>	2'21±0'282 <sup>c</sup>

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto al valor de la izquierda de la fila tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es p < 0'01 y <sup>c</sup> es p < 0'001.

**-Observaciones de tipo organoléptico en frutos refrigerados a 8'5°C de modo intermitente.**

Las observaciones organolépticas muestran que apenas existen diferencias entre los tratamientos 1 y 2 y los controles. Sin embargo, la maduración de los frutos del lote 3 se vio retrasada aproximadamente en un día con respecto a los controles. Los frutos del tratamiento 4 vieron retrasada su maduración entre 1'5 y 2 días con respecto a los controles. El retraso en la maduración de los frutos de los lotes 3 y 4 corresponde aproximadamente al tiempo de refrigeración aplicado.

Los frutos de todos los tratamientos completaron su maduración sin que apareciesen síntomas de daños por frío.

**IV.3.8. PREENFRIAMIENTO RAPIDO.**

En los antecedentes de esta memoria se ha descrito la utilidad de los procedimientos de preenfriamiento rápido de la fruta antes de su entrada en la cámara frigorífica.

Los experimentos que se describen a continuación se han realizado con el propósito de estudiar la posibilidad y utilidad de aplicar el preenfriamiento rápido a la refrigeración de las chirimoyas a 12°C. Su posible uso estaría limitado por la aparición de daños por frío, aspecto que se estudia a continuación.

En este estudio (IV.3.8.1. y IV.3.8.2.) se han utilizado frutos recolectados en Motril en la época temprana de la temporada de recolección.

**IV.3.8.1. PREENFRIAMIENTO RAPIDO A 1°C SEGUIDO DE MADURACION A 23°C.**

**-Tratamiento térmico de los frutos.**

Los frutos se dividieron en lotes que fueron sometidos a los tratamientos térmicos que a continuación se describen:

## RESULTADOS

- Control: los frutos se mantuvieron a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  (humedad relativa de  $80 \pm 10\%$ ) hasta su maduración.
- TA- $12^\circ\text{C}$ : los frutos se introdujeron en una cámara a  $1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (humedad relativa de  $90 \pm 10\%$ ) hasta que la temperatura de un termómetro con su bulbo en el centro de un fruto testigo disminuyó desde la temperatura ambiente (TA) hasta  $12^\circ\text{C}$  (pasaron 1'4 horas en la cámara de  $1^\circ\text{C}$ ). En ese momento se trasladaron a la cámara de  $23^\circ\text{C}$ .
- TA- $8^\circ\text{C}$ : ídem  $8^\circ\text{C}$  (pasaron 2'08 horas en la cámara de  $1^\circ\text{C}$ ), momento en el que se trasladaron a la cámara de  $23^\circ\text{C}$ .
- TA- $5^\circ\text{C}$ : ídem  $5^\circ\text{C}$  (pasaron 3 horas en la cámara de  $1^\circ\text{C}$ ), momento en el que se trasladaron a la cámara de  $23^\circ\text{C}$ .
- TA- $1^\circ\text{C}$ : ídem  $1^\circ\text{C}$  (con el intervalo de oscilación de la cámara:  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ), momento en el que se pasaron a la cámara de  $23^\circ\text{C}$  (pasaron 23 horas en la cámara de  $1^\circ\text{C}$ ).
- TA- $1^\circ\text{C} + 12\text{ h}$ : los frutos se introdujeron en la cámara de  $1^\circ\text{C}$  hasta 12 horas después de que la temperatura de los frutos testigo alcanzara  $1^\circ\text{C}$  (pasaron 35 horas en la cámara de  $1^\circ\text{C}$ ), momento en el que se pasaron a la cámara de  $23^\circ\text{C}$ .

### **-Concentración tisular de etileno en el preenfriamiento rápido a $1^\circ\text{C}$ seguido de maduración a $23^\circ\text{C}$ .**

Los frutos TA- $1^\circ\text{C}+12\text{h}$  muestran unos niveles de etileno tisular el 3º DTR más bajos que los controles (Tabla XXXIX). El pico de etileno se produce en los controles el 4º DTR, mientras que en los tratamientos TA- $1^\circ\text{C}$  y TA- $1^\circ\text{C}+12\text{h}$  aún no se había alcanzado el máximo.

### **-Parámetros físicos y fisicoquímicos en el preenfriamiento rápido a $1^\circ\text{C}$ seguido de maduración a $23^\circ\text{C}$ .**

La textura evolucionó de modo similar en los 5 tratamientos y el control, al menos a partir del 3º DTR (Tabla XL).

Los frutos TA- $1^\circ\text{C}+12\text{h}$  mostraron el 3º DTR un retraso en la evolución del contenido en SST con respecto a los controles (Tabla XLI), desapareciendo las diferencias el 5º DTR, cuando todos los frutos estaban maduros. El resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles.

Tabla XXXIX. Concentración de etileno tisular en chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de maduración a 23°C.

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
Tratamiento	DTR: 0	3	4	5	
23°C	0'24±0'063	2'0±0'76	6'2±1'50	3'0±1'21	
TA-12°C	=	2'1±0'81	5'8±1'35	2'0±0'38	
TA-8°C	=	1'0±0'40	9±4'0	7±5'1	
TA-5°C	=	1'5±0'69	5'0±3'21	14±9'8	
TA-1°C	=	1'0±0'43	5'0±1'88	8'6±1'63 <sup>a</sup>	
TA-1°C+12h	=	0'27±0'074 <sup>a</sup>	3'4±1'25	8'3±1'19 <sup>a</sup>	

-La concentración de etileno tisular se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma columna.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores que encabezan una columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es p < 0'05.

Tabla XL. Textura del mesocarpio de chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de maduración a 23°C.

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
Tratamiento	DTR: 0	3	4	5	
23°C	98±5'9	17±9'2	2'8±0'77	1'7±0'00	
TA-12°C	=	10'7±1'36	7'0±1'64 <sup>a</sup>	1'7±0'00	
TA-8°C	=	8'8±0'44	4'7±0'67	< 0'8	
TA-5°C	=	42±18'0	4'7±0'67	< 0'8	
TA-1°C	=	35±28'4	3'5±0'67	< 0'8	
TA-1°C+12h	=	35±9'8	5'9±2'10	1'7±0'00	

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al que encabeza la columna.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores que encabezan una columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es p < 0'05.

El pH del mesocarpio de los frutos TA-1°C+12h también mostró el 3º DTR un retraso con respecto a los controles (Tabla XLII). Los otros tratamientos mostraron diferencias significativas el 4º DTR. Todas las diferencias se anularon el 5º DTR, cuando todos los frutos habían madurado.

No hay diferencias significativas en los porcentajes de pérdida de peso de los frutos de distintos tratamientos (Tabla XLIII).

**-Observaciones de tipo organoléptico en el preenfriamiento rápido a 1°C seguido de maduración a 23°C.**

Un hecho notorio observado el 4º DTR fue la presencia de zonas pardeadas en el epicarpio de todos los frutos preenfriados, mientras que en los controles, ya maduros, sólo había pardeamiento en los bordes de algunos carpelos. Los frutos preenfriados aún no habían madurado, apreciándose en ellos una variación regular del grado de madurez en relación con el tiempo de refrigeración.

**Tabla XLI. Sólidos solubles totales en mesocarpio de chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de maduración a 23°C.**

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
Tratamiento	DTR: 0	3	4	5	
23°C	6'41±0'278	20'5±0'59	23'9±0'45	24'4±1'43	
TA-12°C	=	19'5±0'34	23'6±0'98	25'6±0'95	
TA-8°C	=	20'9±0'42	23'4±0'39	24'4±0'77	
TA-5°C	=	19'6±2'42	24'1±0'33	21'9±1'03	
TA-1°C	=	19±3'4	23'2±1'27	22'8±1'48	
TA-1°C+12h	=	17'47±0'267 <sup>c</sup>	21'9±0'50 <sup>a</sup>	24'2±0'57	

-El contenido en sólidos solubles totales se expresa en °Brix.  
 -El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al que encabeza la columna.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores que encabezan una columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es p < 0'05 y <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XLII. pH del mesocarpio de chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de maduración a 23°C.

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
Tratamiento	DTR: 0	3	4	5	
23°C	6'23±0'041	4'84±0'112	4'38±0'069	4'56±0'151	
TA-12°C	=	4'84±0'055	4'79±0'043 <sup>c</sup>	4'61±0'103	
TA-8°C	=	5'05±0'192	4'66±0'112	4'66±0'055	
TA-5°C	=	4'98±0'130	4'84±0'115 <sup>b</sup>	4'62±0'091	
TA-1°C	=	5'044±0'0242	4'83±0'039 <sup>c</sup>	4'49±0'106	
TA-1°C+12h	=	5'48±0'197 <sup>a</sup>	4'89±0'107 <sup>b</sup>	4'67±0'047	

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al que encabeza la columna.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores que encabezan una columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es p < 0'05, <sup>b</sup> es p < 0'01 y <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla XLIII. Porcentaje de pérdida de peso en chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de maduración a 23°C.

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
Tratamiento	DTR: 0	3	4	5	
23°C	0	6'07±0'159	8'1±0'45	10'8±1'58	
TA-12°C	0	5'40±0'180 <sup>a</sup>	9'2±0'40	11'1±0'52	
TA-8°C	0	7'0±0'95	9'51±0'131 <sup>a</sup>	9'7±0'39	
TA-5°C	0	7'3±0'78	10'38±0'264 <sup>b</sup>	10'2±1'63	
TA 1°C	0	5'4±0'54	8'15±0'233	8'8±0'83	
TA-1°C+12h	0	5'1±0'43	7'62±0'288	9'4±0'41	

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores control que encabezan una columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es p < 0'05 y <sup>b</sup> es p < 0'01.

El 5º DTR todos los frutos estaban muy maduros y en algunos de los controles la pulpa comenzaba a senescer. En todos había zonas del epicarpio pardeadas.

#### IV.3.8.2. PREENFRIAMIENTO RÁPIDO A 1°C SEGUIDO DE CONSERVACION A 12°C Y MADURACION A 23°C.

Después de comprobar que el preenfriamiento rápido a 1°C seguido de maduración a 23°C provoca la aparición de síntomas de daños por frío consistentes en el pardeamiento precoz del epicarpio del fruto, se decidió estudiar el comportamiento de los frutos al someterlos a preenfriamiento rápido seguido de conservación a 12°C.

##### -Tratamiento térmico de los frutos.

Los frutos se dividieron en grupos que fueron sometidos a los tratamientos térmicos que a continuación se describen:

-Control: los frutos se mantuvieron a  $12 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (humedad relativa de  $85 \pm 5\%$ ) sin preenfriamiento rápido hasta su maduración.

-Tratamientos  $12^\circ\text{C}_n/23^\circ\text{C}$ : los frutos se introdujeron en una cámara a  $1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (humedad relativa de  $90 \pm 5\%$ ) hasta que la temperatura de un termómetro con su bulbo en el centro de un fruto testigo alcanzó los  $12^\circ\text{C}$  (pasaron 1'4 horas en la cámara de  $1^\circ\text{C}$ ). En ese momento se pasaron a la cámara de  $12^\circ\text{C}$ . El día "n" tras la recolección (n = 7, 9 o 12) el lote se incubó a  $23^\circ\text{C}$ . Los parámetros analíticos correspondientes al día "n" se midieron en frutos recién salidos de la refrigeración.

##### -Concentración tisular de etileno en el preenfriamiento rápido a 1°C seguido de conservación a 12°C.

Los frutos control experimentaron el ya conocido incremento de los niveles tisulares de etileno durante la refrigeración a  $12^\circ\text{C}$  (Tabla XLIV). Los frutos sometidos a preenfriamiento rápido mostraron niveles similares a los controles el 7º y 9º DTR, pero no el 12º DTR, cuando ya estaban maduros. Se observó un rápido incremento en los niveles de etileno de los frutos incubados a  $23^\circ\text{C}$  tras 7 días a  $12^\circ\text{C}$ , cuando aún no habían madurado. Sin embargo, cuando los frutos calentados ya estaban maduros ( $12^\circ\text{C}_{12}/23^\circ\text{C}$ ) no se observó ningún incremento de etileno.

Tabla XLIV. Concentración de etileno tisular en chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de conservación a 12°C.

Procedencia:		Motril		
Epoca:		temprana		
DTR	Control	12°C <sub>7</sub> /23°C	12°C <sub>9</sub> /23°C	12°C <sub>12</sub> /23°C
0	0'24±0'063			
7	2'4±0'41 <sup>c</sup>	6'4±1'79	=	=
8		15'1±0'36 <sup>c</sup>		
9	4'3±0'34 <sup>c</sup>	36±6'3 <sup>b</sup>	28±15'0	=
10			16±5'0	
12	65±7'1 <sup>c</sup>			18±3'9 <sub>3</sub>
13				16±5'9

-La concentración de etileno tisular se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado en la misma columna a la izquierda.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto al dato que encabeza la columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ . Las diferencias de los frutos que continúan bajo refrigeración con respecto a un control tienen el siguiente grado de significación: <sub>3</sub> es  $p < 0'001$ .

#### -Parámetros físicos y fisicoquímicos en el preenfriamiento rápido a 1°C seguido de conservación a 12°C.

El contenido del mesocarpio en SST evolucionó del mismo modo en los frutos preenfriados y en los controles durante la refrigeración (Tabla XLV). En los frutos incubados a 23°C el 7º DTR se observó una evolución posterior más rápida de los SST que está acorde con la aceleración general de la maduración.

El pH del mesocarpio evolucionó de modo similar en los frutos tratados y en los controles, acelerándose su disminución en los incubados a 23°C el 7º DTR, cuando aún estaban lejos de la madurez (Tabla XLVI).

La evolución en la textura del mesocarpio no se vio afectada de modo significativo por el preenfriamiento rápido (Tabla XLVII). La textura disminuyó con mayor rapidez en los frutos incubados a 23°C cuando aún estaban lejos de la madurez (12°C<sub>7</sub>/23°C).



Tabla XLV. Contenido en sólidos solubles totales del mesocarpio de chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de conservación a 12°C.

Procedencia:		Motril		
Epoca:		temprana		
DTR	Control	12°C <sub>7</sub> /23°C	12°C <sub>9</sub> /23°C	12°C <sub>12</sub> /23°C
0	6'41±0'278			
7	19'4±0'75 <sup>c</sup>	20'5±1'75	=	=
8		23'2±0'89		
9	20'4±0'91 <sup>c</sup>	23'4±0'55	21'7±0'80	=
10			22'1±0'64	
12	23'0±0'61 <sup>c</sup>			22'6±0'42
13				24'30±0'168 <sup>b</sup>

-El contenido en sólidos solubles totales se expresa en °Brix.  
 -El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado en la misma columna a la izquierda.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto al dato que encabeza la columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Tabla XLVI. pH del mesocarpio de chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de conservación a 12°C.

Procedencia:		Motril		
Epoca:		temprana		
DTR	Control	12°C <sub>7</sub> /23°C	12°C <sub>9</sub> /23°C	12°C <sub>12</sub> /23°C
0	6'23±0'041			
7	5'206±0'0111 <sup>c</sup>	5'21±0'078	=	=
8		4'77±0'048 <sup>c</sup>		
9	5'044±0'0294 <sup>c</sup>	4'73±0'192 <sup>a</sup>	4'92±0'051	=
10			4'86±0'137	
12	4'574±0'0209 <sup>c</sup>			4'82±0'201
13				4'79±0'284

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.  
 -El signo "-" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado en la misma columna a la izquierda.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto al dato que encabeza la columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Tabla XLVII. Textura del mesocarpio de chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C seguido de conservación a 12°C.

Procedencia:		Motril			
Epoca:		temprana			
DTR	Control	12°C <sub>7</sub> /23°C	12°C <sub>9</sub> /23°C	12°C <sub>12</sub> /23°C	
0	99'6±6'0				
7	37±11'6 <sup>c</sup>	31±10'2	=	=	
8		4'07±1'02 <sup>a</sup>			
9	10'2±0'81 <sup>c</sup>	< 0'8 <sup>a</sup>	10'5±1'05	=	
10			1'7±0'00 <sup>c</sup>		
12	1'3±0'38 <sup>c</sup>			< 0'8	
13				< 0'8	

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto al dato que encabeza la columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

La pérdida de peso de los frutos fue ligeramente superior en los frutos prerrefrigerados que en los controles (Tabla XLVIII). También se observaron mayores pérdidas de peso durante la incubación a 23°C que en los controles a 12°C.

**-Observaciones de tipo organoléptico en el preenfriamiento rápido a 1°C seguido de conservación a 12°C.**

El preenfriamiento rápido aceleró notablemente el pardeamiento del epicarpio: el 90 DTR los frutos preenfriados que continuaban a 12°C ya presentaron zonas pardeadas, a diferencia de los controles, que sólo mostraron un ligero pardeamiento en los bordes de algunos carpelos. Los caracteres organolépticos del resto de los frutos preenfriados fue similar al de los controles.

Tabla XLVIII. Porcentaje de pérdida de peso en chirimoyas sometidas a preenfriamiento rápido en cámara a 1°C (90 ± 5 % de humedad relativa) seguido de conservación a 12°C (85 ± 5 % de humedad relativa).

Procedencia:		Motril		
Epoca:		temprana		
DTR	Control	12°C <sub>7</sub> /23°C	12°C <sub>9</sub> /23°C	12°C <sub>12</sub> /23°C
0	0	0	0	0
7	6'3±0'32 <sup>c</sup>	7'2±0'34 <sup>c</sup>	=	=
8		10'1±0'90 <sup>c</sup>		
9	6'7±0'64 <sup>c</sup>	11'02±0'179 <sup>c</sup>	8'47±0'272 <sup>c<sub>1</sub></sup>	=
10			10'0±0'50 <sup>c</sup>	
12	9'3±0'41 <sup>c</sup>			12'0±2'06 <sup>c</sup>
13				12'1±0'53 <sup>c</sup>

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-El signo "=" indica que el valor del parámetro es idéntico al expresado a la izquierda en la misma línea.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto al dato que encabeza la columna tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

#### IV.4. CONSERVACION EN ATMOSFERAS HIPOBARICAS.

Después de estudiar las posibilidades de conservación de las chirimoyas que brinda la refrigeración y una vez conocidas sus limitaciones, se decidió abordar el estudio de las posibilidades de conservación ofrecidas por el empleo de atmósferas hipobáricas. En los antecedentes de esta memoria se han citado las ventajas de esta técnica en la conservación de otros frutos.

A continuación se describen los experimentos de conservación realizados en distintas condiciones hipobáricas. En todos los casos se utilizaron frutos recolectados en Motril en la época media.

Los frutos recién recolectados fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

-Controles: frutos refrigerados a 10 ± 0'5°C (humedad relativa de 90 ± 5 %) utilizados como control de daños por frío.

-Tratamiento 300 mm Hg/bisulfito sódico: los frutos se introdujeron

en campanas herméticas en las que se hizo el vacío hasta disminuir la presión a 300 mm Hg. La temperatura era de  $10 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa del 100 %. Cada 3 días se renovaba la atmósfera de la campana, momento en el que se extraían frutos para su análisis. Se incluyó en las campanas  $\text{NaHSO}_3$  sólido (0.01 % del peso de los frutos).

- Tratamiento 70 mm Hg/bisulfito sódico: idéntico al anterior pero con  $\text{NaHSO}_3$  sólido (0.01 % del peso de los frutos).
- Tratamiento 70 mm Hg: idéntico al anterior excepto en la ausencia de bisulfito sódico.
- Tratamiento 70 mm Hg/permanganato potásico: idéntico al tratamiento 70 mm Hg pero con  $\text{KMnO}_4$  sólido (5 % del peso de los frutos) mezclado con  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5 % del peso de  $\text{KMnO}_4$ ) para mantener la papilla húmeda.

#### **-Parámetros analíticos y organolépticos.**

Los dos tratamientos a 70 mm Hg sin bisulfito mostraron niveles muy similares de producción de etileno (máximos en torno a  $0.070 \mu\text{l}/(\text{kg}\cdot\text{hora})$  el 12º DTR), que fueron inferiores a los de los tratamientos con bisulfito a 70 y 300 mm Hg (en torno a  $0.3 \mu\text{l}/(\text{kg}\cdot\text{hora})$ ) y estos a su vez fueron inferiores al máximo de los frutos control ( $1.70 \mu\text{l}/(\text{kg}\cdot\text{hora})$  el 7º DTR). No se observó efecto del permanganato potásico.

También la textura se mantuvo en niveles lejanos a los de madurez en todos los tratamientos, pero en los que incluyen bisulfito la textura bajó más (hasta el 52-62 % de la inicial de frutos tomados como referencia el 15º DTR). En los otros dos tratamientos a 70 mm Hg sin bisulfito la textura se mantuvo en torno al 100 % el 15º DTR, frente a un 2.7 % en los controles.

El pH disminuyó en el mesocarpio de los frutos con tratamiento 70 mm Hg/bisulfito hasta valores de 5.1 el 9º DTR, comenzando a elevarse a partir de ese momento hasta 5.7. En los dos tratamientos a 70 mm Hg sin bisulfito y 300 mm Hg/bisulfito el pH no bajó de 5.5, elevándose después hasta 6.5-6.8. Este comportamiento fue absolutamente diferente del mostrado por los controles, donde el pH disminuyó de modo continuo hasta su maduración.

No se observó ningún efecto del  $\text{KMnO}_4$ . Los tratamientos que incluían  $\text{HSO}_3\text{Na}$  sí mostraron diferencias con respecto a los trata-

mientos similares pero sin bisulfito en la textura y producción de etileno. Otro efecto del bisulfito consiste en la observación de niveles de actividad polifenol oxidasa en epicarpio de frutos 70 mm Hg/bisulfito menores en un 40-60 % que los de los frutos sometidos a los otros dos tratamientos con bisulfito.

Las pérdidas de peso fueron en todos los frutos tratados muy inferiores a las de los controles, pues el 18º DTR aún no llegaban al 2 %. Esto se puede interpretar como una desecación mínima de los frutos en una atmósfera saturada de agua y un ritmo metabólico muy bajo que produce pocas pérdidas de carbono en forma de CO<sub>2</sub>.

En todos los tratamientos citados los frutos tenían un aspecto externo excelente, sin pardeamiento ni otras alteraciones del epicarpio, al menos hasta el 18º DTR. Sin embargo, los frutos retirados de las condiciones hipobáricas el 9º DTR e incubados a 20°C se pardeaban de modo anómalo y desarrollaban sabores desagradables y un intenso olor ácido al madurar.

Los controles no desarrollaron síntomas de daños por frío ni otras anomalías.

#### IV.5. CONSERVACION EN ATMOSFERAS HIPOXICAS AUTOGENERADAS.

Uno de los procedimientos usuales en la conservación de frutos consiste en mantenerlos en una atmósfera pobre en O<sub>2</sub> y rica en CO<sub>2</sub>. Frecuentemente la atmósfera hipóxica es generada por los propios frutos, que se conservan en cámaras herméticas con un volumen de aire reducido o bien envueltos en películas plásticas o recubiertos de productos céreos de mayor o menor permeabilidad a los gases (Scott y Roberts, 1966; Scott *et al.*, 1970; Farooqi, 1974; De la Plaza y Merodio, 1987). La menor disponibilidad de oxígeno y la elevada concentración de CO<sub>2</sub> ejercen un efecto de inhibición de la acción del etileno en los frutos y consecuentemente disminuye su intensidad respiratoria y otros procesos asociados a la maduración (Burg y Burg, 1967; 1969; Terai y Mizuno, 1981; Brecht *et al.*, 1982). Este efecto se acentúa si la conservación en atmósferas hipoxicas autogeneradas se combina con una refrigeración de los frutos. En la sección IV.5. se describen los experimentos realizados aplicando diferentes variantes de estas técnicas a la conservación de las chirimoyas.

#### IV.5.1. CONSERVACION EN FRASCOS DE VIDRIO HERMETICOS.

Este experimento se realizó con la intención de conocer el comportamiento de los frutos mantenidos bajo refrigeración en la atmósfera hipóxica generada por los mismos cuando son envueltos en un material totalmente impermeable a los gases. Con este fin se utilizaron recipientes de vidrio de cierre hermético.

Después de su lavado, secado y pesada se introdujo un fruto en cada frasco de vidrio. Tras su cierre hermético fueron refrigerados a  $10 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . La transpiración de los frutos saturó de vapor de agua la atmósfera del frasco.

En la cámara frigorífica (humedad relativa de  $90 \pm 5 \%$ ) se introdujo un grupo de frutos sin envoltorio como control de daños por frío.

#### **-Parámetros físicos y fisicoquímicos de frutos conservados en frascos de vidrio herméticos.**

El pH del mesocarpio disminuyó desde la recolección hasta el 90 DTR, momento en que se invirtió esta tendencia (Tabla XLIX). El último día observado el pH llegó a ser incluso superior al valor mostrado por los frutos recién recolectados.

La textura del mesocarpio disminuyó hasta un 63 % de la inicial el 150 DTR, pero 4 días después se pudo observar que el valor de este parámetro se había incrementado hasta valores próximos a los iniciales (Tabla XLIX).

La pérdida de peso de los frutos fue mínima (Tabla XLIX), como era de esperar en una atmósfera saturada de vapor de  $\text{H}_2\text{O}$  y, presuntamente, con un contenido muy reducido de  $\text{O}_2$  que limita las pérdidas de peso por la actividad respiratoria.

Tabla XLIX. Parámetros físicos y fisicoquímicos de maduración en frutos conservados en frascos de vidrio herméticos a 10°C.

Procedencia:		Motril	
Epoca:		media	
DTR	pH	textura	pérdida de peso
0	6'30±0'209	97±4'3	0
6	5'52±0'143 <sup>a</sup>	89±3'8	0'170±0'0054 <sup>c</sup>
9	5'54±0'177 <sup>a</sup>	83±2'5 <sup>a</sup>	0'214±0'0102 <sup>c</sup>
13	5'96±0'128	70±4'2 <sup>b</sup>	0'305±0'0140 <sup>c</sup>
15	6'20±0'217	61±5'8 <sup>c</sup>	0'58±0'033 <sup>c</sup>
19	6'93±0'183 <sup>a</sup>	90±3'0	1'10±0'047 <sup>c</sup>

-Los datos de textura se expresan como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

#### -Observaciones de tipo organoléptico en frutos conservados en frascos de vidrio herméticos.

Los frutos mantuvieron durante 19 días el aspecto que tenían al ser introducidos en los frascos. Sin embargo, desde el 6º DTR en adelante se observó el siguiente fenómeno: al sacar los frutos de los frascos y exponerlos al aire a 20°C se inició un proceso rápido de pardeamiento que hacía virar el color de todo el epicarpio desde verde a marrón oscuro en 2 o 3 horas.

Exceptuando el mencionado ritmo de pardeamiento, los frutos retirados de los frascos antes del 15º DTR e incubados a 20°C maduraron satisfactoriamente en 4 o 5 días. Por el contrario, los frutos conservados durante más tiempo en los frascos desarrollaron sabores y olores anormales.

Los controles no desarrollaron síntomas de daños por frío ni otras anomalías.

#### IV.5.2. CONSERVACION EN ENVOLTORIOS DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD (PEBD) DE 20 $\mu\text{m}$ DE ESPESOR.

Ya se ha descrito en los antecedentes la utilidad del PEBD en la conservación de diferentes frutos y se ha dicho que el retraso que ocasiona sobre la maduración se debe a que los gases difunden a través de la lámina de PEBD con una dificultad que crece con su grosor. El experimento tipo descrito a continuación se ha realizado con chirimoyas envueltas en PEBD de 20  $\mu\text{m}$  de dos modos distintos:

-Tratamiento "sin cámara": el volumen de aire encerrado entre el fruto y el PEBD fue el menor posible (entre 5 y 20 cc).

-Tratamiento "con cámara": el PEBD encerraba la chirimoya y un volumen de aire de  $3.5 \pm 0.5$  veces el volumen del fruto. Estas determinaciones se hicieron midiendo el volumen de agua desplazado en un vaso graduado al sumergir primero el fruto aislado y más tarde el fruto envuelto con cámara de aire.

-Frutos control sin envoltorio.

Los frutos control y los tratados se refrigeraron a  $10 \pm 0.5^\circ\text{C}$  en una cámara con una humedad relativa de  $90 \pm 0.5\%$ .

**-Concentración de etileno en frutos envueltos en PEBD de 20  $\mu\text{m}$  y en la atmósfera hipóxica que los rodea.**

La concentración de etileno tisular en los frutos del tratamiento "sin cámara" se mantiene en unos niveles muy bajos que no fluctúan más de un 20 % en torno al valor inicial (Tabla L). Sin embargo, los frutos "con cámara" muestran una elevación intensa y continuada del etileno tisular al menos hasta el 16 $\mu\text{DTR}$ , con valores muy superiores a los "sin cámara" (más de 200 veces el 16 $\mu\text{DTR}$ ). La concentración de etileno en la atmósfera hipóxica que rodea al fruto es similar a la del etileno tisular, no hallándose en ningún caso diferencias estadísticamente significativas (siempre  $p > 0.05$ ). Las diferencias halladas entre las atmósferas hipóxicas de ambos tratamientos son similares en términos generales a las halladas entre las muestras de atmósfera tisular.



Tabla L. Concentración de etileno en el fruto envuelto en PEBD de 20  $\mu\text{m}$  y refrigerado a 10°C y en la atmósfera hipóxica que lo rodea.

Procedencia:		Motril		
Epoca:		media		
Tratamiento:		sin cámara		con cámara
DTR	atm. hipóxica	tejido	tejido	atm. hipóxica
0	0	0'031±0'0045	0'0332±0'00281	0
9	0'20±0'107	0'25±0'053 <sup>b</sup>	6'8±1'32 <sup>c</sup> <sub>3</sub>	5'1±1'24 <sup>b</sup> <sub>2</sub>
16	0'415±0'019 <sup>c</sup>	0'36±0'031 <sup>c</sup>	85±16'8 <sup>c</sup> <sub>3</sub>	61±8'4 <sub>3</sub>
21	0'14±0'030 <sup>c</sup>	0'12±0'086		

-La concentración de etileno se expresa como el contenido de etileno en  $\mu\text{l/l}$  (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera hipóxica externa o de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ . Las diferencias en el tratamiento "con cámara" con respecto al mismo tipo de muestra de la misma fecha del tratamiento "sin cámara" tienen el siguiente grado de significación: <sub>1</sub> es  $p < 0'05$ , <sub>2</sub> es  $p < 0'01$  y <sub>3</sub> es  $p < 0'001$ .

#### -Parámetros físicos y fisicoquímicos en frutos conservados en PEBD de 20 $\mu\text{m}$ .

El contenido en SST de los frutos "sin cámara" se incrementó en sólo 3 °Brix en 16 días para después estabilizarse, mientras que los frutos "con cámara" experimentaron un incremento mayor hasta el 16º DTR (Tablas LI y LII). El pH de los primeros se mantuvo estable, frente a una ligera disminución en los segundos. También la textura de los frutos "sin cámara" permaneció estable, a diferencia de los otros. Las pérdidas de peso fueron ligeras en ambos tratamientos, pero en los frutos "con cámara" fueron significativamente mayores (el grado de significación fue de  $p < 0'001$ , no mostrado por tratarse de diferencias entre datos de dos tablas diferentes).

Tabla LI. Parámetros físicos y fisicoquímicos en el fruto envuelto en PEBD de 20  $\mu$ m "sin cámara".

Procedencia:		Motril		
Epoca:		media		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	7'88 $\pm$ 0'224	6'16 $\pm$ 0'224	102'0 $\pm$ 2'23	0
9	9'67 $\pm$ 0'088 <sup>c</sup>	6'46 $\pm$ 0'040	100 $\pm$ 4'1	0'209 $\pm$ 0'0169 <sup>c</sup>
16	10'9 $\pm$ 0'226 <sup>c</sup>	6'16 $\pm$ 0'212	94 $\pm$ 3'6	0'397 $\pm$ 0'0246 <sup>c</sup>
21	10'5 $\pm$ 0'283 <sup>c</sup>	6'05 $\pm$ 0'181	94'8 $\pm$ 2'59	0'685 $\pm$ 0'0238 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Tabla LII. Parámetros físicos y fisicoquímicos en el fruto envuelto en PEBD de 20  $\mu$ m "con cámara".

Procedencia:		Motril		
Epoca:		media		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	7'22 $\pm$ 0'185	5'96 $\pm$ 0'120	98'8 $\pm$ 2'72	0
9	15'4 $\pm$ 0'62 <sup>c</sup>	5'50 $\pm$ 0'176	57'2 $\pm$ 2'94 <sup>c</sup>	0'95 $\pm$ 0'032 <sup>c</sup>
16	19'3 $\pm$ 0'83 <sup>c</sup>	5'45 $\pm$ 0'073 <sup>b</sup>	30 $\pm$ 9'1 <sup>c</sup>	1'51 $\pm$ 0'062 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>a</sup> es  $p < 0'05$ , <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

**-Concentración de etanol en mesocarpio de frutos conservados en envoltorios de PEBD de 20  $\mu$ m.**

La concentración de etanol en el mesocarpio de los frutos "sin cámara" se incrementó espectacularmente a lo largo de todo el período de conservación (Tabla LIII), siendo el incremento de mucha menor cuantía en los frutos "con cámara".

**Tabla LIII. Concentración de etanol en mesocarpio de frutos envueltos en PEBD de 20  $\mu$ m y refrigeradas a 10°C.**

Procedencia:	Motril	
Epoca:	media	
DTR	sin cámara	con cámara
0	< 2'5	< 2'5
9	1.229±13'3 <sup>c</sup>	< 2'5 <sub>3</sub>
16	2.360±15'9 <sup>c</sup>	105'7±1'28 <sup>c,3</sup>
21	3.871±12'0 <sup>c</sup>	-

-La concentración de etanol se expresa en ng por g de mesocarpio.  
 -Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto al valor del día 0 tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ . También se ha comparado cada dato del tratamiento "con cámara" con el del tratamiento "sin cámara" del mismo DTR y las diferencias tienen el siguiente grado de significación: <sup>3</sup> es  $p < 0'001$ .

**-Observaciones de tipo organoléptico en frutos envueltos en PEBD de 20  $\mu$ m.**

Los frutos del tratamiento "con cámara" incubados a 20°C a partir del 9º DTR maduraron normalmente en 3 días. Sin embargo, los frutos que continuaron a 10°C se habían reblandecido de modo irregular el 16º DTR, mostrando manchas rosadas en el mesocarpio, el cual desprendía un intenso olor agrio.

Los frutos del tratamiento "sin cámara" mostraron manchas rosadas y olor agrio el 9º DTR. Al repetir este experimento en varias ocasiones con un tratamiento idéntico el comportamiento de los fru-

tos fue irregular, pues algunas partidas se conservaron bien durante 15 días madurando adecuadamente al sacarlos de la cámara; por el contrario, otros frutos se comportaron como se ha citado. No se halló relación entre la procedencia o el momento de la recolección y el comportamiento de un signo u otro.

Los controles no desarrollaron daños por frío ni otras anomalías.

#### **IV.5.3. CONSERVACION EN ENVOLTORIOS DE VARIAS CAPAS DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD DE 3 $\mu\text{m}$ DE ESPESOR.**

El PEBD de 20  $\mu\text{m}$  sin cámara de aire demostró en el experimento anterior que producía unas condiciones hipóxicas tan severas que no siempre permitían una adecuada conservación de los frutos. Se decidió entonces explorar de modo preliminar las posibilidades de conservación que ofrecía el empleo de envoltorios plásticos de grosores intermedios entre 3 y 20  $\mu\text{m}$ .

##### **-Tratamientos aplicados a los frutos.**

Tras su lavado y baño con fungicida, los frutos fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

-Grupo control: frutos sin envoltorio.

-Grupo 6  $\mu\text{m}$ : frutos con 2 capas de PEBD 3  $\mu\text{m}$ .

-Grupo 9  $\mu\text{m}$ : frutos con 3 capas de PEBD 3  $\mu\text{m}$ .

-Grupo 12  $\mu\text{m}$ : frutos con 4 capas de PEBD 3  $\mu\text{m}$ .

-Grupo 15  $\mu\text{m}$ : frutos con 5 capas de PEBD 3  $\mu\text{m}$ .

Todos los frutos se refrigeraron a  $10 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (humedad relativa de  $90 \pm 5\%$ ).

##### **-Observaciones de tipo organoléptico en la conservación en envoltorios de varias capas de PEBD de 3 $\mu\text{m}$ .**

Se emplearon frutos recolectados en Motril en la época media. Todos los frutos se sacaron de la cámara frigorífica el 14º DTR, catándose los frutos maduros. Los frutos de los grupos que aún no estaban maduros se incubaron a  $20^\circ\text{C}$  durante 1 a 3 días.

Los controles estaban recién maduros a la salida de la cámara o después de un día de incubación a 20°C; habían madurado con normalidad y no presentaban síntomas de daños por frío. Los frutos del grupo 6 µm tenían muy buen aspecto y elevada textura a la salida de la cámara, reblandeciéndose tras 2 días de incubación a 20°C. El epicarpio se había pardeado más de lo normal en frutos madurados en condiciones normales y su pulpa tenía un olor intenso y anormal. Los frutos de los grupos 9, 12 y 15 µm tenían una elevada textura al sacarlos de su envoltorio y mostraban un epicarpio terso y sin signos de pardeamiento. Después de incubarlos durante 3 días a 20°C se reblandeció el epicarpio, pero no el mesocarpio, desprendiendo un intenso olor agrio similar al de los frutos conservados en PEBD de 20 µm de espesor.

#### IV.5.4. CONSERVACION EN POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD (PEBD) DE 3 µm DE ESPESOR.

Tras el fracaso de la conservación de los frutos en PEBD de 6, 9, 12, 15 y 20 µm, se decidió estudiar su comportamiento cuando se refrigeran a  $10 \pm 0.5^\circ\text{C}$  envueltos en PEBD del grosor más fino hallado en el comercio para la conservación de frutos. Un grupo de frutos se trató del modo citado y otro utilizado como control se introdujo sin envoltorio en la misma cámara frigorífica ( $90 \pm 5\%$  de humedad relativa).

**-Concentración de etileno tisular en frutos envueltos en PEBD de 3µm y refrigerados a 10°C y en la atmósfera hipóxica que los rodea.**

La concentración de etileno tisular alcanzó el 90 y 160 DTR valores elevados del mismo orden de magnitud que los medidos en otras ocasiones en frutos que maduran a 10°C sin envoltorio (Tabla LIV). La evolución de este parámetro en la atmósfera hipóxica circundante fue paralela a la evolución tisular.

Tabla LIV. Concentración de etileno en el fruto envuelto en PEBD de 3 µm y refrigerado a 10°C y en la atmósfera hipóxica que lo rodea.

Procedencia:		Motril	
Epoca:		media	
DTR	atm. hipóxica	tejido	
0	0	0'031±0'0045	
9	1'9±0'36 <sup>c</sup>	3'2±0'63 <sup>c</sup>	
16	24±5'3 <sup>b</sup>	38±3'7 <sup>c</sup>	

-La concentración de etileno se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera hipóxica externa o de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Tabla LV. Concentración de etanol en mesocarpio de frutos envueltos en PEBD de 3 µm y refrigerados a 10°C.

Procedencia:		Motril	
Epoca:		media	
DTR			
0	< 2'5		
9	2'72±0'073 <sup>c</sup>		
16	13'2±1'21 <sup>c</sup>		

-La concentración de etanol está expresada en ng por g de mesocarpio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

Tabla LVI. Parámetros físicos y fisicoquímicos en frutos envueltos en PEBD de 3  $\mu\text{m}$ .

Procedencia:		Motril		
Epoca:		media		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	7'88 $\pm$ 0'224	6'16 $\pm$ 0'086	102'3 $\pm$ 2'23	0
9	14'9 $\pm$ 0'57 <sup>c</sup>	5'6 $\pm$ 0'41	75'5 $\pm$ 5'8 <sup>c</sup>	0'689 $\pm$ 0'0292 <sup>c</sup>
16	18'0 $\pm$ 0'76 <sup>c</sup>	5'66 $\pm$ 0'082 <sup>b</sup>	44 $\pm$ 4'6 <sup>c</sup>	1'258 $\pm$ 0'0288 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>b</sup> es  $p < 0'01$  y <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

**-Parámetros físicos y fisicoquímicos en frutos envueltos en PEBD de 3  $\mu\text{m}$  y refrigerados a 10°C.**

pH, SST y textura evolucionaron más lentamente de lo que lo hacen los frutos refrigerados a la misma temperatura sin envoltorio (Tabla LVI). La pérdida de peso fue ligera.

**-Concentración de etanol en mesocarpio de frutos envueltos en PEBD de 3  $\mu\text{m}$  y refrigerados a 10°C.**

La concentración de etanol se elevó ligeramente (Tabla LV) y fue comparable a la habitual en frutos refrigerados a la misma temperatura con libre acceso al aire.

**-Caracteres organolépticos de frutos envueltos en PEBD de 3  $\mu\text{m}$  y refrigerados a 10°C.**

Los frutos retirados de la cámara frigorífica el 9º DTR tenían la piel algo pardeada al salir de su envoltorio plástico. Maduraron correctamente después de 3 días de incubación a 20°C, pero su pulpa era de menos calidad que la de los frutos madurados en condiciones normales: no había sabores extraños o desagradables, pero tampoco

desprendía el aroma agradable propio de estos frutos.

Los frutos observados el 16º DTR terminaron de madurar en 1 día a 20°C después de salir de su envoltorio plástico. Su pulpa tenía sabor alcohólico.

Los frutos control no desarrollaron daños por frío ni otras anomalías.

#### **IV.5.5. CONSERVACION MEDIANTE RECUBRIMIENTOS CEREOS.**

Otro de los medios utilizados para alterar la atmósfera interna de los frutos con el objetivo de retrasar su maduración es el encebado de su piel (Farooqi, 1974; Casas, 1983). El empleo de estos recubrimientos céreos reduce la velocidad del intercambio gaseoso del fruto con la atmósfera que lo rodea y retrasa su maduración mediante el incremento de las concentraciones tisulares de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. En nuestro laboratorio hemos estudiado la posible aplicación de dos ceras comerciales destinadas a la conservación de melones, naranjas y otros frutos: Melonwax y Waterwax.

Tras su lavado, los frutos fueron recubiertos con cera Melonwax o Waterwax (III.2.1.5.). Los tratados con Waterwax se refrigeraron a continuación a 10 ± 0'5°C (humedad relativa de 90 ± 5 %).

#### **-Concentración de etileno en frutos tratados con Waterwax y refrigerados a 10°C.**

La concentración de etileno tisular alcanzó el 9º y 16º DTR valores elevados del mismo orden de magnitud que los medidos en otras ocasiones en frutos que maduran a 10°C sin envoltorio (Tabla LVII). La evolución de este parámetro en la atmósfera hipóxica circundante fue paralela a la evolución tisular.



Tabla LVII. Concentración de etileno en frutos tratados con Waterwax y refrigerados a 10°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	media
DTR	
0	0'031±0'0045
9	8'1±1'01 <sup>c</sup>
16	92±7'0 <sup>c</sup>

-La concentración de etileno se expresa como el contenido de etileno en µl/l (20°C, 1 atm) de una muestra de la atmósfera hipóxica externa o de la atmósfera interna del fruto obtenida mediante vacío.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla LVIII. Concentración de etanol en mesocarpio de frutos tratados con Waterwax y refrigerados a 10°C.

Procedencia:	Motril
Epoca:	media
DTR	
0	< 2'5
9	16'4±1'34 <sup>c</sup>
16	27'8±1'60 <sup>c</sup>

-La concentración de etanol está expresada en ng por g de mesocarpio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es p < 0'001.

Tabla LIX. Parámetros físicos y fisicoquímicos en frutos tratados con Waterwax y refrigerados a 10°C.

Procedencia:		Motril		
Epoca:		media		
DTR	SST	pH	textura	pérdida de peso
0	7'88±0'224	6'16±0'086	102'3±2'23	0
9	16'4±1'34 <sup>c</sup>	5'23±0'130 <sup>c</sup>	66±8'5 <sup>c</sup>	1'40±0'062 <sup>c</sup>
16	20'2±0'49 <sup>c</sup>	4'84±0'098 <sup>c</sup>	3'32±0'214 <sup>c</sup>	2'39±0'136 <sup>c</sup>

-SST indica el contenido en sólidos solubles totales en °Brix.

-La textura se expresa como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia.

-La pérdida de peso de los frutos se expresa como porcentaje con respecto al peso de los frutos en el momento de su llegada al laboratorio.

-Los resultados representan la media aritmética de los valores de 6 frutos analizados por triplicado ± S.E.M. Las diferencias con respecto a los valores iniciales tienen el siguiente grado de significación: <sup>c</sup> es  $p < 0'001$ .

#### -Parámetros físicos y fisicoquímicos en frutos tratados con Waterwax y refrigerados a 10°C.

Tanto el pH como los SST y la textura siguieron en estos frutos el mismo patrón observado en frutos refrigerados sin recubrimiento (Tabla LIX). La pérdida de peso se mantuvo en niveles bajos.

#### -Concentración de etanol en mesocarpio de frutos tratados con Waterwax y refrigerados a 10°C.

El etanol se movió en niveles similares al de los frutos refrigerados sin recubrimiento (Tabla LVIII), lo que parece indicar que los frutos no experimentaron hipoxia durante la refrigeración.

#### -Caracteres organolépticos de frutos tratados con Waterwax.

Los frutos sacados de la cámara frigorífica el 9º DTR e incubados a 20°C maduraron en 3 días. La incubación de estos frutos se realizó sin retirar el recubrimiento céreo, pues para esto se necesita realizar una extracción con disolventes que difícilmente podría

## RESULTADOS

realizar un consumidor en su hogar. Los frutos al reblandecerse experimentaron cambios de color anómalos que consistían en el viraje del color verde inicial a un color gris-verdoso oscuro; también podían observarse puntos de color violeta dispersos por el epicarpio del fruto. La pulpa tenía un sabor anormal.

Los frutos retirados de la cámara frigorífica el 16º DTR ya habían desarrollado parcialmente el cambio de color mencionado y terminaron de madurar en 24 horas a 20°C.

### **-Caracteres organolépticos de frutos tratados con Melonwax.**

Estos frutos fueron desechados inmediatamente después de ser tratados con el producto céreo, pues experimentaron un completo pardeamiento en los 2 minutos posteriores a su contacto con el Melonwax, probablemente debido a los disolventes orgánicos que entran en su composición.

Los frutos control no desarrollaron daños por frío ni otras anomalías.

## **DISCUSSION**

## V. DISCUSION.

En la actualidad existe una gran diversidad de procedimientos de conservación que difieren en aspectos tales como los medios técnicos empleados para modificar el ambiente que rodea al fruto y el grado de madurez adecuado para su aplicación. Para evaluar la utilidad de la aplicación a la chirimoya de algunos de estos procedimientos, hemos creído necesario comparar la evolución de los parámetros de madurez y calidad en cada técnica de conservación con los propios de frutos que maduran en condiciones normales. De este modo podríamos conocer cuál es el período de conservación máximo durante el que cada técnica permite mantener una calidad de los frutos comparable a la de los no manipulados. Por otra parte, esta comparación podría ofrecer información útil sobre las causas del fracaso de determinados procedimientos de conservación.

De acuerdo con lo anterior, se ha realizado un estudio de la maduración en unas condiciones similares a las ambientales medias en la zona costera de origen de los frutos, que son variables pero oscilan en torno a los 20°C y 80 % de humedad relativa. También se ha estudiado la maduración a 23°C para conocer la influencia que tiene sobre la maduración una temperatura ligeramente superior y a la que en ocasiones también están expuestos los frutos.

### V.1. EL PAPEL DEL ETILENO EN LA MADURACION DE LAS CHIRIMOYAS.

Ya en 1954 Biale et al. publicaron datos de chirimoyas del cultivar Booth que indican que se trata de un fruto climatérico de maduración extremadamente rápida, pues a 15°C el máximo respiratorio se alcanzó el 40 o 50 DTR, observándose el máximo de producción de etileno el 70 DTR. De la Plaza (1980) también observó curvas respiratorias climatéricas a 20°C en chirimoyas del cultivar Fino de Jete objeto de nuestro estudio. Por consiguiente, la naturaleza climatérica de estos frutos parece estar bien establecida.

Multitud de estudios realizados en diferentes frutos climatéricos indican que de modo general el etileno es el agente que dispara el resto de fenómenos que se producen durante la maduración (Brady et al., 1987). Sin embargo, en las chirimoyas Booth la elevación climatérica de la respiración comenzó 3 días antes que la elevación

de la producción de etileno (Biale *et al.*, 1954). Observaciones similares han sido realizadas en el cultivar Chaffey por Kosiyachinda y Young (1975) y en los cultivares Deliciosa y Baldwin por Brown *et al.* (1988). Podría parecer que estos datos cuestionan la función del gas como disparador de la maduración en chirimoyas. A continuación se discute este aspecto con más detalle.

En el cultivar Fino de Jete se observan cambios en distintos parámetros de maduración que son anteriores (almidón y SST) o simultáneos (textura y proteínas) a la elevación de la producción de etileno y de sus niveles tisulares. Concretamente, el incremento en los niveles tisulares es estadísticamente significativo con respecto al día de la recolección el 2º DTR a 20°C (Tabla II), pero no antes. Lo mismo sucede con la producción de etileno: se puede afirmar que se ha elevado el 2º DTR con respecto al día de la recolección, pues la diferencia existente el 1º DTR no es significativa (figura 2). Por otra parte (Tabla III), el 1º DTR ya se observa un incremento en el contenido en SST y el 2º DTR hay cambios en textura (Tabla III) y proteínas del mesocarpio (Tabla VI). Gutiérrez *et al.* (1993) han observado que el 1º DTR ya se ha producido una disminución en el contenido de almidón. Otros autores ya citados han realizado observaciones similares en cultivares y variedades diferentes. Sin embargo, estos datos no despojan necesariamente al etileno de un papel como disparador de la maduración en chirimoyas. Se ha observado que distintos frutos responden a concentraciones exógenas de etileno del orden de 0'1 µl/l (Kader, 1980). El día de la recolección se ha medido un nivel de etileno tisular de 0'029 µl/l, pero la concentración umbral de etileno necesaria para el disparo de la maduración podría ser similar o incluso inferior a esos niveles, pudiendo alcanzarse en menos de 12 horas tras la recolección.

El valor del máximo de producción fue de 49 µl/(kg·h) para Fino de Jete (figura 2), mientras que los otros cultivares mostraron valores de 130 a 150 µl/(kg·h). Estos valores sitúan a las chirimoyas entre los frutos con mayor velocidad de producción de etileno, aunque existen otros frutos, como el albaricoque, con velocidades de producción muy superiores: más de 1.000 µl/(kg·h) (Inaba y Nakamura, 1981). Como el valor umbral de etileno para disparar la maduración es aparentemente muy bajo, podemos considerar que existe un gran exceso de producción de etileno sobre este mínimo necesario. Este exceso de etileno puede ser que tenga algún sentido fisiológico o que sea simplemente una consecuencia no útil de la inducción del sistema II de producción de etileno.

En la figura 3 se puede observar que en frutos que maduran a 20°C el nivel de etileno tisular presenta un pico, como también sucede en la curva de producción, pero retrasado aproximadamente 1'5 días. Esto probablemente se debe a que en el momento de alcanzarse el máximo de producción los tejidos aún no están saturados de gas y parte del sintetizado se sigue acumulando.

En esta memoria se exponen datos de producción de etileno y también de concentración de etileno tisular. En principio, ambos parámetros podrían ser objeto de críticas. Por una parte, los datos de producción de etileno no son tales en sentido estricto, pues parte del etileno producido se acumula en el fruto aumentando los niveles tisulares. Los datos presentados representan estrictamente la velocidad a la que emana etileno del fruto. Esto es cierto, pero un procedimiento de cálculo que aquí sería prolijo exponer indica que el etileno acumulado en los tejidos no llega, en el peor de los casos, al 2 % del total producido. Por consiguiente, la velocidad a la que el etileno emana del fruto se aproxima, en más de un 98 %, a la velocidad de producción de etileno.

Por otra parte, hay que aclarar que el parámetro denominado en esta memoria "concentración tisular de etileno" representa de modo estricto la concentración de etileno en los gases extraídos del fruto mediante vacío en unas determinadas condiciones. El volumen de gas desprendido es el resultante de la mezcla de gases disueltos en los tejidos con los contenidos en las cavidades internas del fruto. Por consiguiente, este parámetro no es en sentido estricto lo que su nombre indica, pero sí debe existir una correlación estrecha entre él y los niveles de etileno disuelto en los tejidos.

## **V.2. LA REFRIGERACION COMO METODO DE CONSERVACION DE LAS CHIRIMOYAS.**

Sabemos que la temperatura es un factor ambiental que influye poderosamente sobre la velocidad a la que maduran los frutos. La refrigeración es un procedimiento de conservación que necesita de una tecnología de fácil acceso y con unos costes soportables por productos que alcanzan en los mercados precios mucho menores que las chirimoyas. Por este motivo decidimos estudiar el comportamiento de las chirimoyas bajo refrigeración a distintas temperaturas, comparando los resultados obtenidos con los de maduración en condiciones

normales.

En frutos refrigerados a 10°C (figura 2) se observó un lento incremento en la velocidad de producción de etileno, con un máximo de sólo 1'2  $\mu\text{l}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ . Los datos muestran que la refrigeración disminuye poderosamente tanto la velocidad de producción de etileno como la cantidad total de etileno desprendido (área bajo la curva) en comparación con la maduración a 20°C. Esta restricción desaparece al recalentar las chirimoyas que aún no han madurado: los frutos refrigerados a 10°C durante 4 días e incubados después a 20°C mostraron una elevación climatérica comparable a la de los frutos que no habían sido refrigerados, aunque con un retraso atribuible a la refrigeración.

Un aspecto notable de esta curva es la obtención de un pequeño máximo inmediatamente anterior a la elevación brusca de la producción y situado unas 30 horas después del final de la refrigeración, atribuible al menos en parte a la expulsión del exceso de etileno disuelto a 10°C con respecto a la solubilidad del gas en los tejidos a 20°C.

En la figura 3 podemos observar que la producción de etileno y la concentración de etileno tisular responden de modo opuesto al refrigerar las chirimoyas. La producción de etileno se ralentiza notablemente a 10°C con respecto a lo que sucede a 20°C. Sin embargo, en los frutos refrigerados se alcanzan niveles de etileno tisular considerablemente más elevados que a 20°C. En la figura 4 podemos observar con más detalle este interesante comportamiento. A medida que disminuye la temperatura de almacenamiento, la concentración tisular de etileno alcanza máximos de mayor magnitud, pese a que la producción es menor. A pesar de esto, se puede observar que la acumulación de etileno se ve retrasada en el tiempo a medida que disminuye la temperatura de conservación, lo que produce inevitablemente un retraso en la maduración a juzgar por otros parámetros maduración y por las características organolépticas de los frutos.

El fenómeno citado que consiste en la observación de máximos de etileno tisular menores a temperaturas más elevadas puede explicarse teniendo en cuenta que al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de difusión de los gases y disminuye su solubilidad, lo que facilita la salida del fruto del etileno producido.



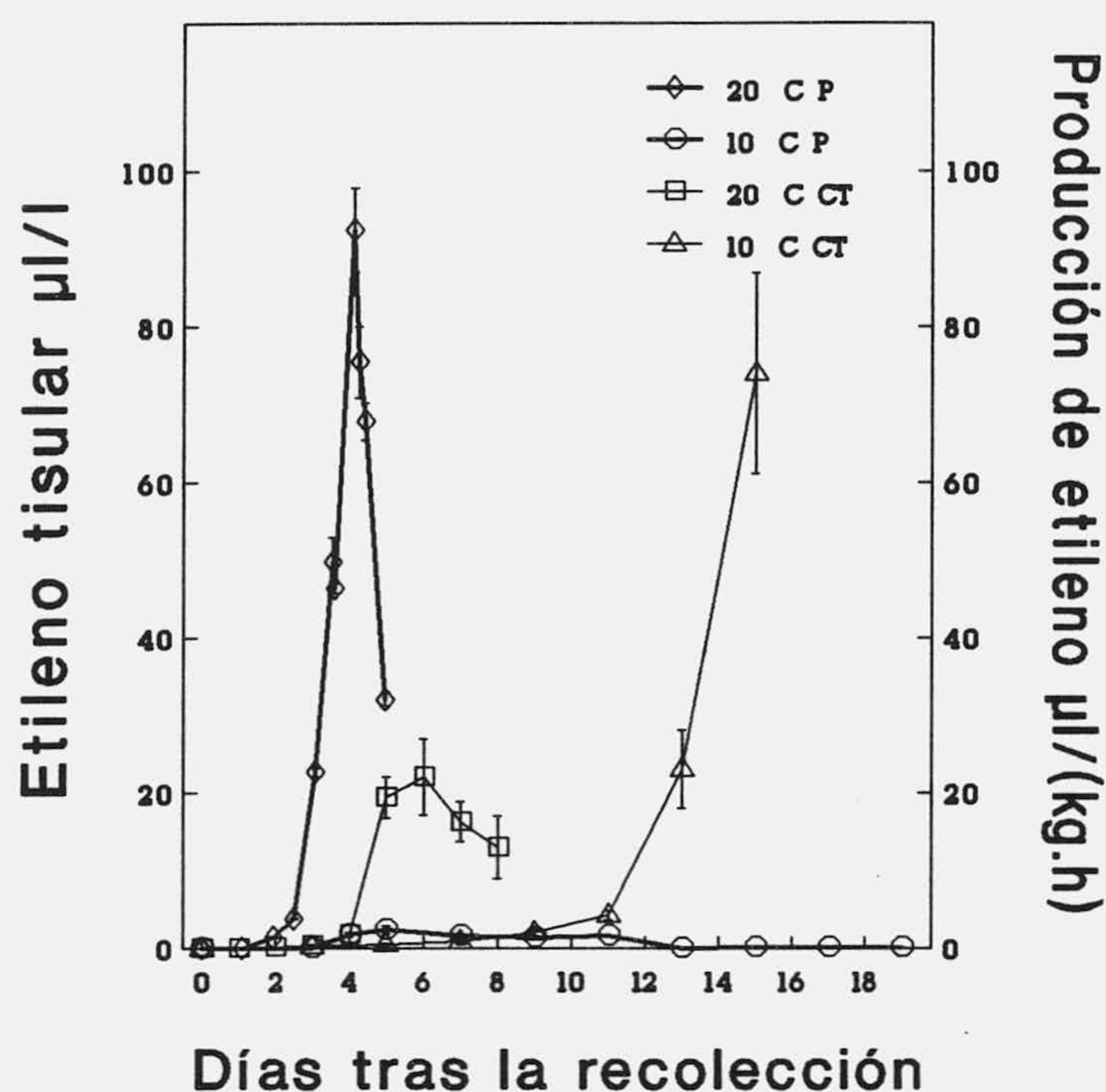


Figura 3. Producción de etileno y concentración de etileno tisular en frutos incubados a 10 o 20°C. 20 C P es producción de etileno a 20°C. 10 C CT es concentración tisular de etileno a 10°C.

La disminución de la textura durante la maduración ha sido observada en guayaba (Brown y Wills, 1983), papaya (An y Paull, 1990), kiwi (Hopkirk *et al.*, 1989; Cotter *et al.*, 1991), melocotón (Horton, 1992), plátano (Inaba *et al.*, 1984), manzana (Klein *et al.*, 1990), mango (Medlicott, 1990a) y chirimoya (Fúster y Préstamo, 1980), entre otros frutos.

Nuestros datos (figura 5A) indican que el reblandecimiento de los frutos es significativo a partir del 2º DTR a 20°C. Por consiguiente, teniendo en cuenta que la estructura de la pared celular es en gran parte responsable de la textura de los frutos (Huber, 1983), la inducción de la síntesis de hidrolasas de la pared celular (Fischer y Bennet, 1991) debe tener lugar desde los momentos iniciales de la maduración. El reblandecimiento continúa una vez que los fru-

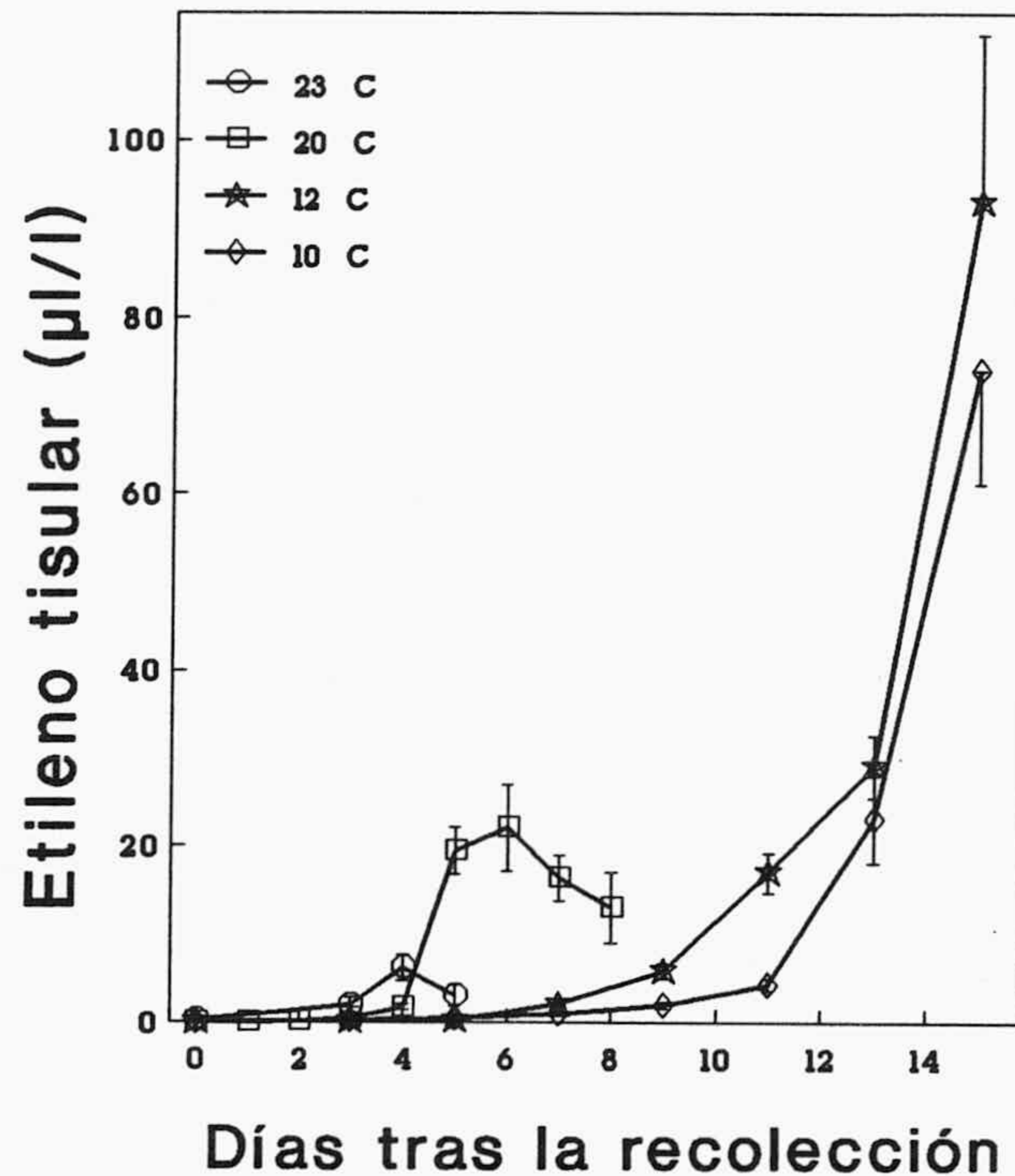


Figura 4. Evolución de los niveles de etileno tisular en chirimoyas durante su almacenamiento a distintas temperaturas.

tos han madurado (50 DTR) y prosigue durante la senescencia (60 DTR), del mismo modo que se observa en los cultivares Deliciosa y Baldwin (Brown, 1988). Esto indica que los enzimas previamente sintetizados siguen siendo activos durante la senescencia. Un comportamiento similar se observa a 23°C, aunque el incremento de temperatura aparentemente permite una aceleración de la síntesis de hidrolasas y/o de la actividad de estas hidrolasas que permite que el 40 DTR la textura de los frutos a 23°C sea similar a la mostrada el 50 DTR a 20°C, lo que significa que la aceleración de la disminución de la textura provocada por el incremento de temperatura está en torno al 20 %, similar al incremento observado en la consecución de la plena madurez organoléptica. A 12°C y 10°C también se observa una correlación directa entre la disminución de la temperatura y el tiempo necesario para el reblandecimiento.

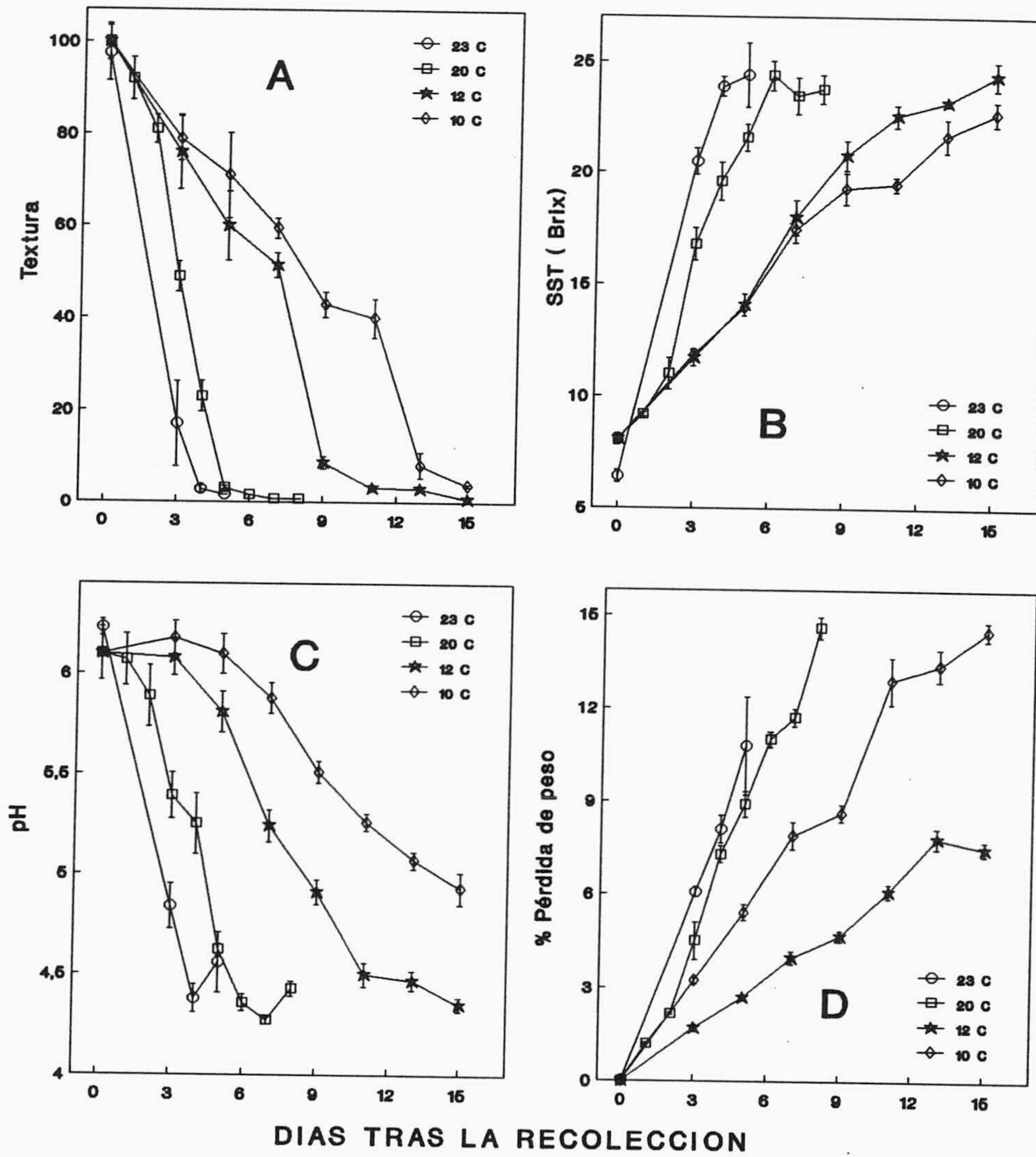
Durante la maduración tiene lugar un incremento en el contenido

en SST que a 20°C es observable ya el 1º DTR. El máximo se alcanza cuando los frutos ya están senescentes (figura 5B). Esto es explicable en gran parte por la masiva degradación de almidón y el incremento en azúcares solubles observado por Gutiérrez *et al.* (1992; 1993). Sin embargo, a 20°C todo el almidón se ha degradado ya cuando el fruto ha alcanzado su madurez óptima (5º DTR), a pesar de lo cual se observa un incremento significativo en los SST ( $p < 0,01$ ) desde el 5º al 6º DTR; a este incremento pueden contribuir la pérdida de peso de los frutos observada entre estos dos días (en torno al 2 %) y el aporte de solutos procedente de la degradación de las paredes celulares (Grierson y Tucker, 1983), pues la disminución de textura continúa después del 5º DTR (figura 5A). Un incremento en el contenido en SST ha sido observado también en nectarina (Brecht y Kader, 1984), melocotón (Horton, 1992), plátano (Inaba *et al.*, 1984), kiwi (Cooter *et al.*, 1991), mango (Medlicott *et al.*, 1990a), guanábano (*Annona muricata* L.; Paull, 1982) y otros frutos con reservas de almidón. La velocidad de evolución también es más rápida a medida que se eleva la temperatura.

La disminución del pH a lo largo de la maduración es tanto más rápida cuanto más elevada es la temperatura (figura 5C). A 12, 20 y 23°C los parámetros SST, textura y pH evolucionan a velocidades diferentes pero de modo aproximadamente paralelo (figuras 5A, 5B y 5C). Esto se cumple a 10°C para los parámetros SST y textura, pero no para el pH, por razones que se discutirán más adelante.

La disminución del pH puede deberse a una biosíntesis de ácidos carboxílicos hidrosolubles. En muchos otros frutos, tales como nectarina (Brecht y Kader, 1984), "loquat" (Hirai, 1982), albaricoque (Hirai, 1981), manzana (Klein *et al.*, 1990), kiwi (Matsumoto *et al.*, 1983) y otros se produce el fenómeno contrario: una disminución de la acidez medible total y un incremento del pH. Incluso en frutos filogenéticamente más cercanos, tales como la atemoya (*Annona cherimola x squamosa*) no se detectan cambios significativos de pH (oscila entre 4,9 y 5,1) ni de acidez medible durante la maduración ni la senescencia (Brown *et al.*, 1988). En guanábano (*Annona muricata* L.) sí se produce una disminución del pH (Paull, 1982) debido principalmente a un incremento en los contenidos de ácidos málico y cítrico (Paull *et al.*, 1983).

La disminución de peso observada es tanto menor cuanto más elevada es la humedad relativa y más baja la temperatura (figura 5D). La menor diferencia se observa entre 20 y 23°C, pues la humedad



Figuras 5A, B, C y D. Evolución de distintos parámetros durante el almacenamiento de chirimoyas a diferentes temperaturas. 5A: textura, expresada como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia. 5B: sólidos solubles totales. 5C: pH. 5D: porcentaje de pérdida de peso.

relativa era la misma (80 %) en ambos casos. Podemos aventurar que las pérdidas de peso se deben a la contribución de la desecación y la respiración del fruto, especialmente durante el máximo climatérico. La chirimoya pierde un 14 % de su peso tras 14 días a 10°C y 90 % de humedad relativa, mientras que en otros frutos, como la carambola, las pérdidas de peso son apreciablemente menores (Campbell et al., 1989). Las distintas características del epicarpio y metabolismo de frutos diferentes explican las diferentes pérdidas de peso en igualdad de condiciones de almacenamiento.

El etanol es un metabolito producido por los tejidos vegetales en condiciones de anaerobiosis (Jamieson, 1980; Lehle et al., 1991), aunque Baldwin et al. (1991) han observado en tomates que maduran en condiciones aerobias unos niveles medios de 1.200 ng/g con oscilaciones de  $\pm 30$  %. En mesocarpio de chirimoyas inicialmente no hay etanol detectable, pero desde el 3º DTR se produce una elevación progresiva que se dispara cuando el fruto entra en senescencia (fig. 6). Gutiérrez et al. (1992) han observado que durante la maduración de las chirimoyas a 20°C se produce un progresivo deterioro de las mitocondrias en el mesocarpio, visible ya el 3º DTR y muy intenso el 6º DTR. De acuerdo con estos estudios, podemos suponer que, debido a la masiva degradación de almidón que tiene lugar durante la maduración, se produce un notable incremento en la concentración de intermediarios glucolíticos y de la ruta de las pentosas fosfato. Sin embargo, el progresivo deterioro de las mitocondrias junto con una elevada disponibilidad de sustratos haría que estos experimentasen una glucolisis anaerobia. A 10 y 12°C la elevación en los niveles de etanol se produce más tarde debido probablemente al retraso del climaterio ocasionado por la refrigeración (figura 6).

Distintos investigadores han observado un incremento en la velocidad de síntesis de proteínas en otros frutos en los primeros momentos del climaterio (Sacher, 1973; Drouet y Hartmann, 1982; Tucker y Laties, 1984). En tomate se ha establecido que este incremento de síntesis de proteínas se debe a la expresión de genes específicos a nivel transcripcional y post-transcripcional (Lincoln y Fischer, 1988). Recientemente (Montero et al., 1993) han observado en mesocarpio de chirimoyas verdes perfiles electroforéticos diferentes a los mostrados por frutos maduros. En el mesocarpio de chirimoyas que maduran a 20°C se ha observado un incremento en la concentración de proteínas hasta el 3º DTR a 20°C (fig. 7), cuando aún no se ha producido el máximo de concentración tisular y de producción de etileno (es decir, durante el climaterio, según la

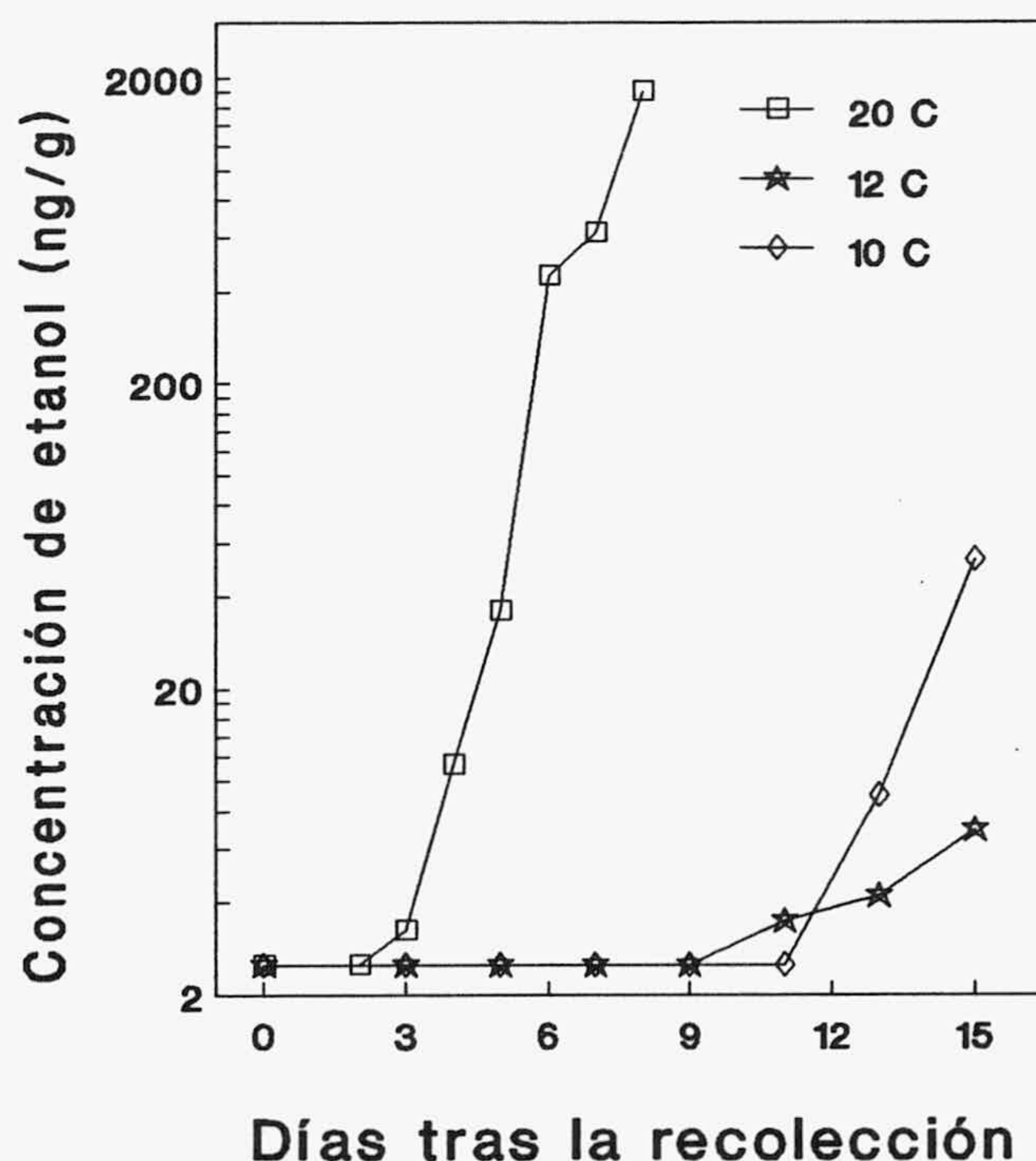


Figura 6. Concentración de etanol en mesocarpio de chirimoyas almacenadas a 20, 12 o 10°C.

definición de McMurchie *et al.* (1972)). Esto parece indicar que durante estos días se produce una intensa síntesis de los enzimas necesarios para la maduración que supera a la velocidad de degradación de otras proteínas. Un incremento similar se produce también a 10 y 12°C. La concentración de proteínas en mesocarpio disminuye notablemente cuando el fruto alcanza la madurez, lo que se traduce en una disminución más rápida a 20°C que a 10 y 12°C.

Dado que existe un intenso recambio de proteínas durante la maduración, decidimos estudiar la evolución de las actividades enzimáticas alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, pues tienen una importancia fundamental en la interconversión de aminoácidos (Braunstein, 1973) y podrían desempeñar un papel importante en el aporte de los aminoácidos necesarios para la síntesis de determinados enzimas de maduración. La alanina aminotransferasa disminuye

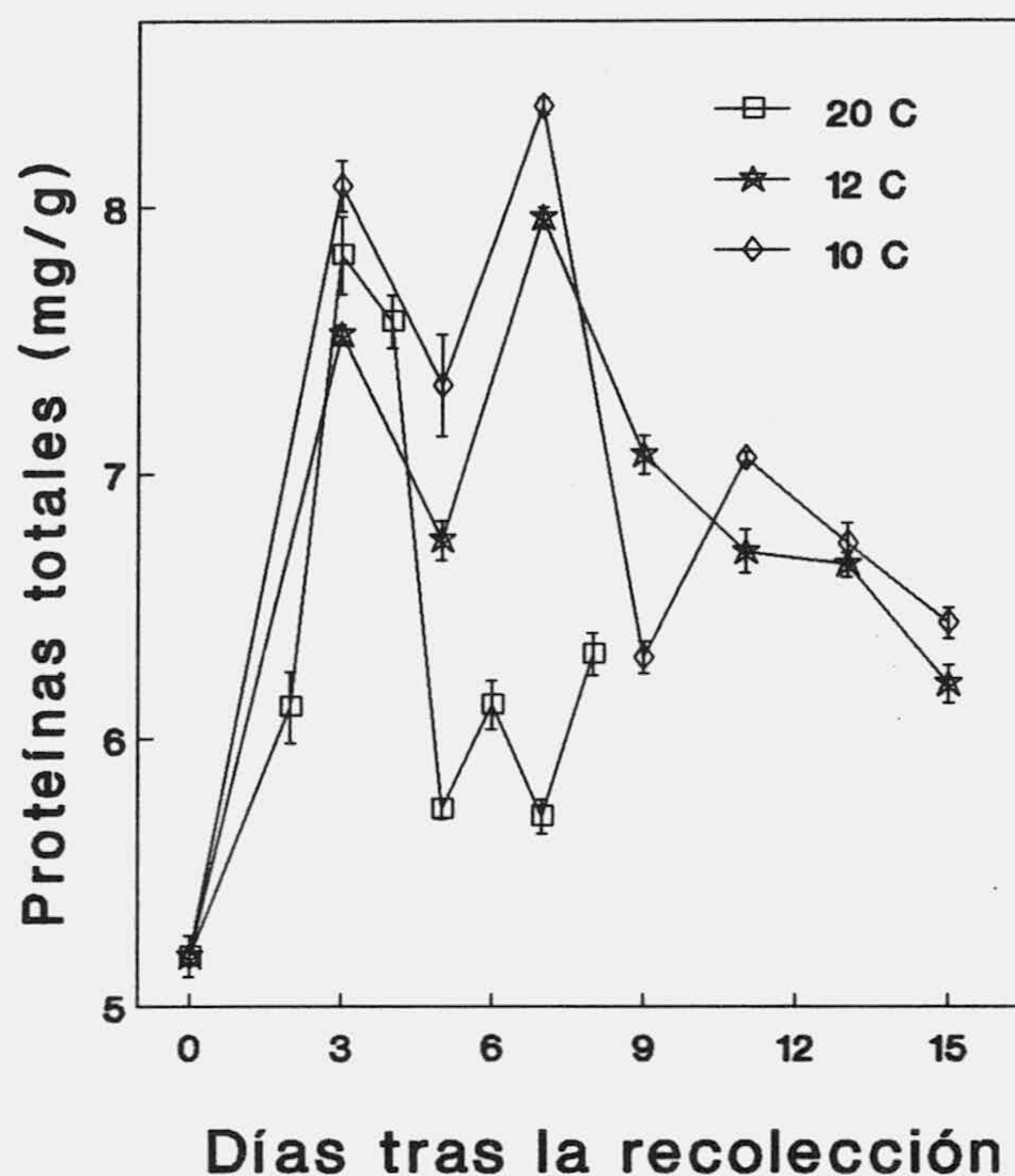


Figura 7. Evolución de la concentración de proteínas en mesocarpio de chirimoyas durante su almacenamiento a 20, 12 y 10°C.

notablemente durante la maduración a 20°C y también, pero más lentamente, a 12°C, tendiendo a estabilizarse con los frutos ya maduros (fig. 8). Los niveles de aspartato aminotransferasa a estas dos temperaturas (fig. 8) se mantienen en torno al valor inicial sin desviaciones significativas. Estos datos muestran que no hay síntesis neta de las dos aminotransferasas durante la maduración. La disminución de actividad de la alanina aminotransferasa puede deberse simplemente a una corta vida media del enzima y a que su reposición se detenga cuando ya está avanzada la maduración.

Las actividades glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa son las primeras reacciones de la vía de las pentosas fosfato, una forma de degradar glucosa que es útil como fuente de NADPH y de ribosa-5-fosfato (Axelrod, 1967). Hemos estudiado la evolución de estas actividades en mesocarpio de chirimoya a

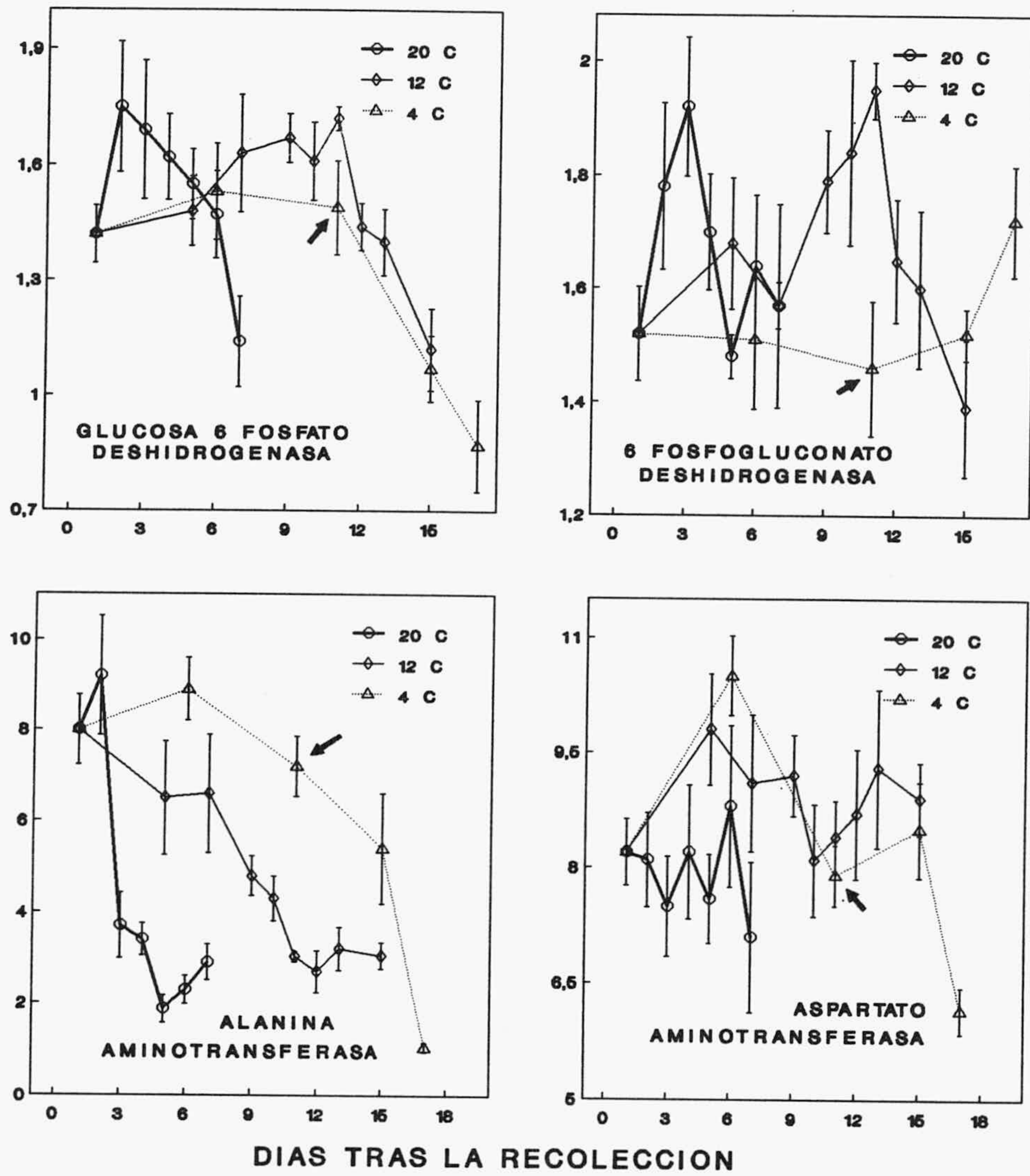


Figura 8. Evolución de distintas actividades enzimáticas en mesocarpio de chirimoya durante su almacenamiento en distintas condiciones: temperatura constante de 20°C, 10°C o refrigeración a 4°C seguida (flecha) de incubación a 20°C.



20°C (figura 8), observando que en los primeros días tras la recolección se produce un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en los niveles de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, coincidente con un incremento en los niveles de proteínas (figura 7). Podemos suponer que esto indica una síntesis de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa con la finalidad de proporcionar energía y ribosa-5-fosfato utilizados en la síntesis de ARN y proteínas durante la maduración. Este incremento de actividad se produce a 12°C con un retraso atribuible a la refrigeración. A esta temperatura también se ha observado un incremento en los niveles de 6-fosfogluconato deshidrogenasa que puede interpretarse de un modo similar (figura 8).

Es un hecho bien establecido que los fenoles participan en la defensa de los tejidos vegetales frente a distintas agresiones externas (Brune y Van Lelyveld, 1982). En este mecanismo defensivo participa la actividad polifenol oxidasa, que actúa sobre su sustrato cuando el tonoplasto que lo contiene pierde su integridad, lo que ocasiona la formación de polifenoles de un color que oscila entre el amarillo y el pardo oscuro. Durante la senescencia se desarrolla una suave tonalidad amarillenta en el mesocarpio. La actividad polifenol oxidasa está presente en este tejido en el momento de la recolección (figura 9), probablemente como un elemento del mecanismo de defensa citado. Durante los primeros días de la maduración disminuyen a la mitad sus niveles y no vuelven a elevarse, lo que sugiere que el tono amarillo que posteriormente se desarrolla, atribuido a los polifenoles formados, no está relacionado con un incremento de la actividad del enzima sino con un incremento de la permeabilidad de la membrana vacuolar. La refrigeración a 12°C sólo produce un retraso en la caída de los niveles.

La actividad fosfatasa ácida se elevó durante la maduración tanto a 20°C como a 12°C (figura 9), alcanzando un máximo cuando los frutos estaba muy próximos a su madurez o ya recién maduros. Es muy probable que esta actividad enzimática esté relacionada con la maduración de las chirimoyas, pues durante este proceso hay modificaciones en los niveles de fosfatasa ácida. Sin embargo, desconocemos el significado fisiológico de estas oscilaciones.

La actividad amilasa experimentó un notable incremento durante los primeros días de la maduración a 20°C (figura 9), coherente con el mencionado incremento en SST (figura 5B) y la disminución del contenido en almidón estudiado por Gutiérrez *et al.* (1992; 1993). A 12°C la evolución es similar, aunque más lenta, como era de esperar.

Es bien conocido el efecto protector de la catalasa contra la acción nociva del  $H_2O_2$ . Los niveles presentes en mesocarpio de chirimoya caen disminuyen durante la maduración tanto a  $20^\circ C$  como a  $12^\circ C$ , aunque con mayor lentitud durante la refrigeración, como era de esperar (figura 9). Cabe la posibilidad de la disminución de actividad progrese al ritmo marcado por la acción de las proteasas sin que haya síntesis de nuevo enzima cuya actividad parece ser poco útil en un fruto que próximamente estará senescente.

#### **-Daños por frío.**

Las chirimoyas refrigeradas a  $4^\circ C$  se conservaron aparentemente en perfectas condiciones durante 11 días en la cámara, pero al ser incubadas a temperatura ambiente demostraron que habían sufrido severos daños por frío tanto en epicarpio como en mesocarpio y que había fracasado la maduración. Perdieron todo su valor comercial. Esta manifestación de los daños por frío posterior a la refrigeración también ha sido observado en mangos (Medlicott *et al.*, 1990b) y otros frutos (Paull, 1990). También la *Annona squamosa* experimenta severos daños por frío tras 5 días a  $4^\circ C$  que hacen fracasar la maduración (Broughton y Tan, 1979), mientras que la atemoya sufre daños menos severos (Brown y Scott, 1985; Batten, 1990).

La aparición de daños por frío en chirimoyas cv. Fino de Jete demostró la necesidad de determinar su temperatura crítica de conservación. Sin embargo, se ha observado que la temperatura crítica depende de la época en la que se recolectan los frutos: cuando se refrigeró a  $9^\circ C$  durante 15 días un grupo de frutos recolectados en la época media, la mayor parte de ellos sufrió leves daños por frío. A una temperatura ligeramente superior,  $9.5^\circ C$ , el porcentaje de frutos dañados disminuyó a menos del 10 %. Todas las chirimoyas de la época media refrigerados a  $10^\circ C$  completaron normalmente su maduración en la cámara o al salir de ella. Sin embargo, todos los frutos de la época temprana que han sido refrigerados a  $10^\circ C$  sufrieron daños cuya severidad disminuía al aproximarse su fecha de recolección al invierno e ir disminuyendo la temperatura media. De este modo, podemos afirmar que la tolerancia de las chirimoyas al frío depende de la época de recolección. Esto también ha sido observado en tomates (Dodd *et al.*, 1991) y mangos (Medlicott *et al.*, 1991).

También se puede afirmar que la refrigeración a  $10^\circ C$  de frutos recién recolectados en la época media permite retrasar la maduración

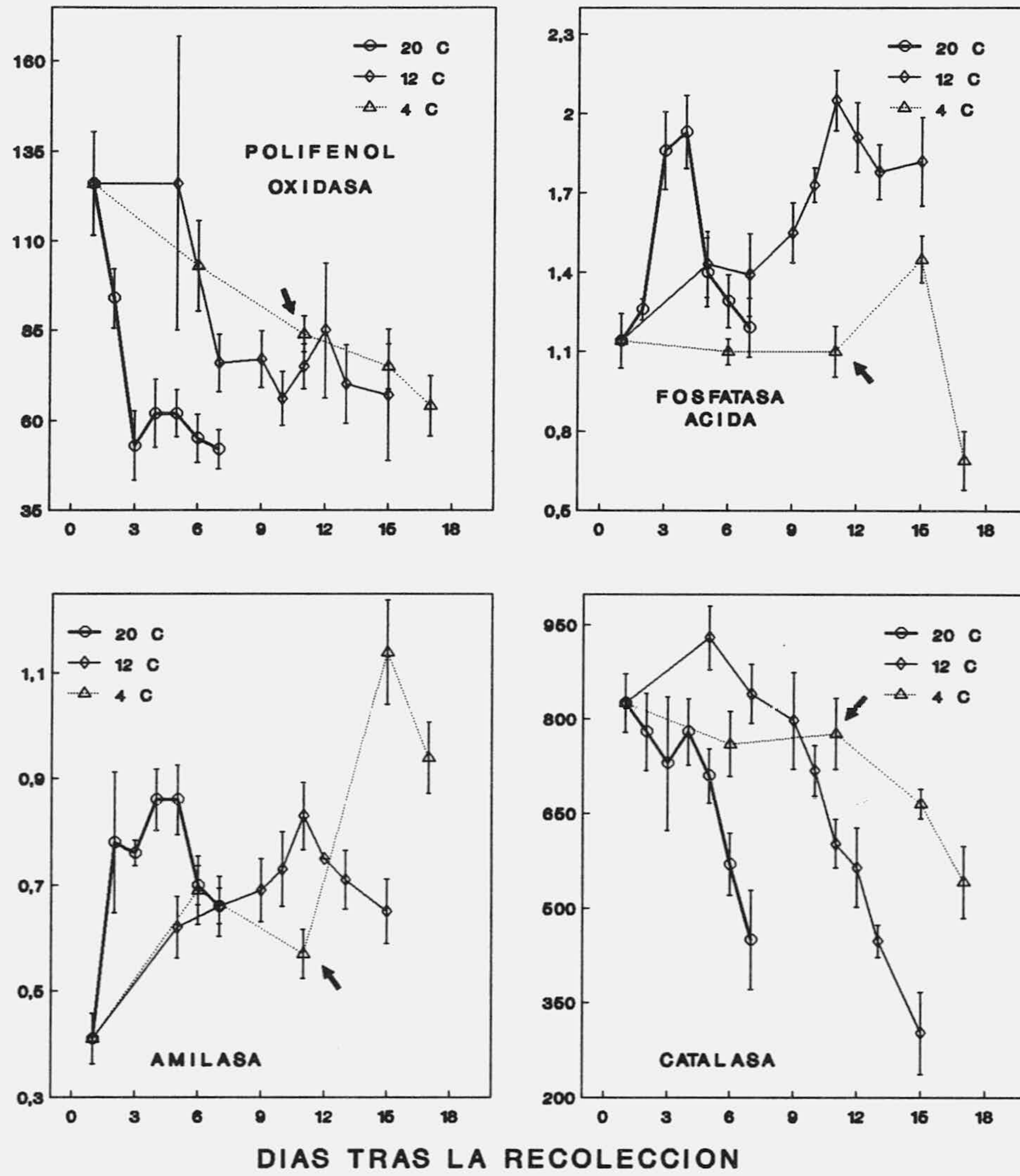


Figura 9. Evolución de distintas actividades enzimáticas en mesocarpio de chirimoya durante su almacenamiento en distintas condiciones: temperatura constante de 20°C, 10°C o refrigeración a 4°C seguida (flecha) de incubación a 20°C.

de los frutos entre 15 y 17 días después de su recolección sin pérdida de calidad, aunque las pérdidas de peso pueden aproximarse al 15 %.

La chirimoya es uno de los frutos más sensibles al frío, pues se han observado daños ya a 10°C. Sin embargo, existen otros frutos notablemente más sensibles, como la Annona squamosa, que pierde sabor y cuyo epicarpio se pardea si madura incluso a 15°C (Broughton y Tan, 1979).

La aparición y severidad de los daños por frío depende del tiempo de exposición a las bajas temperaturas (Autio y Bramlage, 1986). Hemos comprobado que esto también sucede en chirimoyas. La exposición a 4°C durante 11 días produce severos daños que hacen fracasar la maduración tras una incubación a 23°C. Sin embargo, los frutos refrigerados a 1°C durante 35 horas (12 horas después de que la temperatura de su centro alcanzara 1'5°C (fig. 1)) sufrieron un pardeamiento precoz del epicarpio, pero maduraron correctamente 1 día después que los controles.

Los síntomas de daños por frío observados difieren cualitativa y cuantitativamente de unas fechas de recolección a otras. Son síntomas de daños leves, como los experimentados por los frutos refrigerados a 9°C en la época media, un tono amarillento del mesocarpio y una disminución de su sabor y aroma. Más intensos fueron los daños de algunos frutos de época temprana refrigerados a 10°C, tales como picado del epicarpio o incluso su pardeamiento precoz, olor agrio del mesocarpio, presencia de manchas pardas y grises y pH que no disminuye por debajo de 4'9, más elevado del correspondiente según su textura y SST (figuras 5A, B y C). Este pH final más elevado es sin duda un síntoma de daños por frío, pues en frutos recolectados en la época media e incubados también a 10°C el pH disminuye a mayor velocidad y alcanza en 15 días valores comparables a los de frutos maduros. Los niveles de etanol se elevaron más rápidamente en chirimoyas dañadas por frío a 10°C (frutos de época temprana) que en las refrigeradas a 12°C (figura 6). Estos hechos concuerdan con publicaciones clásicas (Pantastico et al., 1967; Murata, 1969) que indican que en tejidos vegetales que han sufrido daños por frío se acumulan sustancias asociadas al metabolismo intermediario entre las que se encuentra el etanol.

Los síntomas más intensos fueron los observados tras incubar a 20°C a frutos que habían sido refrigerados a 4°C: pardeamiento total

del epicarpio, fracaso de la maduración con reblandecimiento irregular, intenso olor agrio del mesocarpio y presencia de manchas rosadas. Otros frutos muestran algunas de las alteraciones aquí citadas, pero no todas, y también experimentan daños que no aparecen en chirimoyas (Saltveit y Morris, 1990). Se ha observado en distintos frutos que los daños por frío pueden incrementar la producción de etileno (Wang y Adams, 1982; Chan *et al.*, 1985), llegando incluso a disparar el inicio del climaterio (Paull, 1990) acelerando su maduración (Jacman *et al.*, 1992), pero esto no sucede en chirimoyas.

Fúster y Préstamo (1980) afirman que las chirimoyas refrigeradas a 5°C sufren daños por frío consistentes en pardeamiento de piel y pulpa que no impiden su maduración hasta lograr buen sabor. Por otra parte, Montero *et al.* (1993) han observado daños por frío en chirimoyas refrigeradas a 6°C, temperatura a la cual los frutos no maduran y establecen la temperatura crítica para estos frutos en 8°C. Los datos obtenidos en nuestro laboratorio están en contradicción con los de los autores citados.

Los caracteres organolépticos de los frutos incubados a 12°C demuestran que estos frutos alcanzan la madurez el 12º DTR y durante 2 días más se mantienen maduros, no senescentes y con una calidad comparable a la de los frutos madurados en condiciones normales. Se han refrigerado a 12°C frutos recolectados a lo largo de las tres épocas y en ningún caso se han observado daños por frío. Podemos afirmar que 12°C es la temperatura de refrigeración óptima para las tres épocas de recolección, excepto para los frutos recolectados en la temporada media. Estos últimos admiten ser refrigerados a 10°C, con lo cual su maduración se retrasa entre 3 y 5 días más que a 12°C. La humedad relativa en la cámara debe ser elevada para disminuir las pérdidas de peso. Cuando se conservan los frutos a 12°C hay un aspecto en el que su calidad es incluso superior a la de los frutos madurados a 20 o 23°C: el pardeamiento del epicarpio es notablemente menor, incluso estando los frutos ya plenamente maduros.

El período de conservación que permite la refrigeración a 12°C o 10°C puede parecer corto, pero merece la pena estudiar con algún detalle las posibilidades que ofrece. Cuando, en 1986, indagamos sobre las necesidades reales de los comerciantes de chirimoyas, se nos informó que un período de conservación de 3 semanas resolvería los problemas derivados de su rápido deterioro y de una temporada de recolección con agudos dientes de sierra en la producción. La llegada masiva de las chirimoyas a las lonjas combinada con su carácter

extremadamente perecedero influye notablemente sobre su precio. Periodos de conservación, como los alcanzados, de 12 o 15 a 17 días (12 o 10°C) no resuelven completamente el problema planteado por los dientes de sierra en la producción, pero sí ofrecen la posibilidad del transporte a todos los mercados de Europa. Para el fresón de Huelva, que tiene su principal mercado en Europa Central, son útiles periodos de conservación incluso de una semana (Olías *et al.*, 1993).

#### **-Preenfriamiento rápido.**

Los experimentos de refrigeración a 12°C se realizaron en una cámara dotada de un grupo frigorífico con potencia suficiente como para mantener la temperatura ambiente a  $12 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a lo largo de las 24 horas que siguen a la introducción de chirimoyas calientes. De este modo, la temperatura de los frutos en su centro disminuyó desde 23 a 15°C en 4 horas, y alcanzó los 12,5°C en 23 horas (fig. 2). La refrigeración industrial no debe retrasar notablemente el enfriamiento de los tejidos del fruto hasta la temperatura adecuada de conservación, pues esto podría acortar su vida comercial. Una solución podría consistir en el empleo de grupos frigoríficos de la potencia adecuada.

Una segunda posibilidad (en principio) podría consistir en la aplicación de un procedimiento de preenfriamiento rápido, ya descrito en los Antecedentes de esta memoria. Esto, además, evitaría el calentamiento de las chirimoyas ya refrigeradas cuando entrase una nueva carga de fruta caliente. Para estudiar las posibilidades de empleo del preenfriamiento rápido, en primer lugar se preenfriaron chirimoyas hasta 12°C o temperaturas inferiores en cámara de 1°C, dejándolas madurar a continuación a 23°C. Todos los frutos tratados sufrieron un pardeamiento precoz del epicarpio antes de su maduración que desaconseja la aplicación comercial del preenfriamiento rápido en estas condiciones, pues disminuiría el valor comercial del fruto. No hubo otro tipo de daños. Los frutos maduraron con normalidad, pero con un retraso que guarda una correlación aproximada con las horas de refrigeración aplicadas a cada tratamiento, a juzgar por los parámetros cuantitativos y organolépticos de maduración (apartado IV.3.8.1.).

En los frutos preenfriados hasta 12°C en cámara de 1°C y luego conservados a 12°C se observan algunas diferencias con respecto a los controles refrigerados a 12°C sin preenfriamiento rápido: la

concentración de etileno tisular alcanzada cuando el fruto ya está maduro (120 DTR) es apreciablemente menor en los frutos preenfriados que continúan a 12°C (Tabla XLIV). Este fenómeno probablemente esté relacionado con el pardeamiento precoz del epicarpio observado sólo en los frutos preenfriados, que puede ser debido a unas alteraciones estructurales que disminuyan la resistencia de este tejido a la difusión del etileno. Esta hipótesis también explicaría la superior pérdida de peso de los frutos preenfriados, que es estadísticamente significativa el 90 DTR (Tabla XLVIII). Los parámetros textura, SST y pH evolucionan de modo similar en frutos preenfriados y en controles durante la refrigeración (Tablas XLV, XLVI y XLVII). Cuando los frutos preenfriados se incuban a 23°C, maduran normalmente y en ese sentido se acelera la evolución de la textura, SST y pH. Su sabor y aroma son similares a los de los frutos control, pero el epicarpio se pardea precozmente.

Por consiguiente, la necesidad de un enfriamiento de la fruta a un ritmo no demasiado lento y el riesgo planteado por la entrada de nueva fruta caliente en una cámara que contiene chirimoyas ya frías no pueden ser resueltos mediante el uso aislado del preenfriamiento rápido. Es posible que sean útiles soluciones tales como la combinación del preenfriamiento rápido con un tratamiento previo de las chirimoyas con antioxidantes (etoxiquina o difenilamina). En último extremo puede recurrirse al empleo de equipos frigoríficos más potentes, pero también más caros.

#### **Infecciones micóticas.**

La maduración en condiciones normales es demasiado rápida como para que se manifiesten lesiones importantes en chirimoyas infectadas por hongos antes de ser consumidos. Sin embargo, el retraso de la maduración permite el desarrollo de infecciones micóticas que en ocasiones afectan al 65 % de los frutos. También en guayabas refrigeradas a 7 u 11°C se ha observado una fuerte incidencia de micosis (Vázquez-Ochoa y Colinas-León, 1990), así como en tomates a 12°C en MA (Marangoni y Stanley, 1991). La aparición de micosis durante la refrigeración a 10 o 12°C supone un problema tan serio que puede impedir la aplicación comercial de esta técnica si no se resuelve. Por otra parte, las micosis pueden provocar la aparición de artefactos cuando se realizan estudios metabólicos, pues se ha observado la aparición de segundos máximos respiratorios o de producción de etileno en chirimoyas cv. 'Baldwin' y 'Deliciosa' y en A.

squamosa, respectivamente, asociados a la aparición de podredumbres fúngicas (Brown *et al.*, 1988). Por este motivo se ha utilizado de modo rutinario el fungicida Imazalil en todos los experimentos (excepto en los estudios de eficacia de otros fungicidas), desechándose los frutos que ocasionalmente han aparecido infectados.

Tras estudiar la utilidad de diferentes fungicidas, hemos observado que la aplicación de Imazalil de la forma descrita a las chirimoyas impide el desarrollo de todos los hongos detectados en los controles excepto Botrytis cinerea, contra el cual su eficacia no es total. Es probable que, con el transcurso del tiempo, haya variación en las especies y cepas de hongos más abundantes en las zonas de cultivo de las chirimoyas, lo que haría posible la aparición de resistencias al Imazalil. Esta posibilidad siempre existe, pero hasta ahora se ha observado que durante los 3 años en los que se trataron los frutos con este fungicida se obtuvieron porcentajes de frutos infectados entre el 0 y el 4 %.

La aplicación del Imazalil en frutas está autorizada en la Comunidad Europea. Se ha demostrado que tiene un bajo poder de penetración a través del epicarpio de manzanas (Van Leemput *et al.*, 1986). Podemos afirmar que la utilización de los procedimientos de refrigeración antes propuestos está forzosamente ligada a la aplicación previa de este fungicida.

#### **-Refrigeración intermitente.**

Ya se han citado en los Resultados (IV.3.7.4.) los motivos que nos han impulsado a estudiar la posible utilidad de la refrigeración intermitente a 8'5°C. Los SST, pH y textura de las chirimoyas tratadas evolucionaron en el sentido de una maduración con un retraso con respecto a los controles similar al número de horas de refrigeración aplicadas en cada tratamiento. De igual modo se comportaron los caracteres organolépticos. No se ha observado ningún tipo de daño ni pérdida de calidad con respecto a los controles. Aparentemente, los frutos no han sufrido daños debido al poco tiempo (40 horas de refrigeración como máximo) de refrigeración aplicado. También puede haber contribuido el fenómeno observado en otros berenjenas y judías refrigeradas que consiste en la disminución de los daños por frío cuando se aplica calor de modo intermitente (Ito y Nakamura, 1984). En resumen, la práctica de la refrigeración intermitente, hasta ahora llevada a cabo de modo rutinario en la costa granadina sin



haber realizado un estudio riguroso de su eficacia, consigue un retraso de la maduración aproximadamente igual al tiempo de refrigeración aplicado, al menos en periodos no mayores de 40 horas.

#### -Premaduración.

La premaduración es un procedimiento que puede ser aplicado a las papayas para incrementar su resistencia a los daños por frío: cuando están verdes y se refrigeran a 9°C sufren daños por frío, pero esto no sucede si se refrigeran a 2°C cuando están semimaduras (Chen y Paull, 1986; Chan, 1988). Sabemos que las chirimoyas recién recolectadas no pueden conservarse a temperaturas inferiores a 10 o 12°C sin que aparezcan daños por frío. Decidimos estudiar si estos daños aparecían también en frutos maduros. En el primer experimento de este tipo observamos que los frutos madurados a 23°C durante 3 días y posteriormente refrigerados a 1°C, mantenían el epicarpio sin pardear durante 21 días y la pulpa no había perdido calidad el 28º DTR. Los frutos se conservaron en mejores condiciones si se refrigeraban recién maduros (3º DTR) que plenamente maduros (4º DTR). La refrigeración a 1°C demostró que retrasaba el envejecimiento de los frutos más que a 4°C. El nivel de etileno tisular (figura 10) sufre una notable disminución al refrigerar los frutos (más intensa a 1°C que a 4°C) debido posiblemente a una inhibición de su síntesis combinada con la fuga (por difusión) del gas antes presente. Esto también se ha observado en frutos refrigerados tras madurar a 20°C (figura 11). La textura de los frutos continuó disminuyendo durante la refrigeración (figura 12A), lo que parece indicar que las hidrolasas de la pared celular siguen teniendo actividad detectable a bajas temperaturas. Tanto los SST como el pH ya han alcanzado valores correspondientes a frutos maduros en el momento de la refrigeración, por lo que apenas oscilan durante la misma (figuras 12B y C). Las pérdidas de peso de los frutos son tanto más rápidas cuanto más elevada es la temperatura y también cuanto más baja es la humedad relativa (figuras 5D y 12D). No aparecieron daños por frío ni a 1 ni a 4°C. Aparentemente existe un punto en la curva de maduración en el que los frutos pierden sensibilidad al frío. Esta pérdida de sensibilidad debe estar relacionada con el momento en que la síntesis de proteínas necesarias para la maduración ya se ha producido y, además, ya no se requiere la integridad de los orgánulos subcelulares. Por otra parte, una vez que las chirimoyas han perdido su sensibilidad a los daños por frío, la mejor conservación se consigue refrigerando cuanto antes a la menor temperatura que no ofrece riesgo de

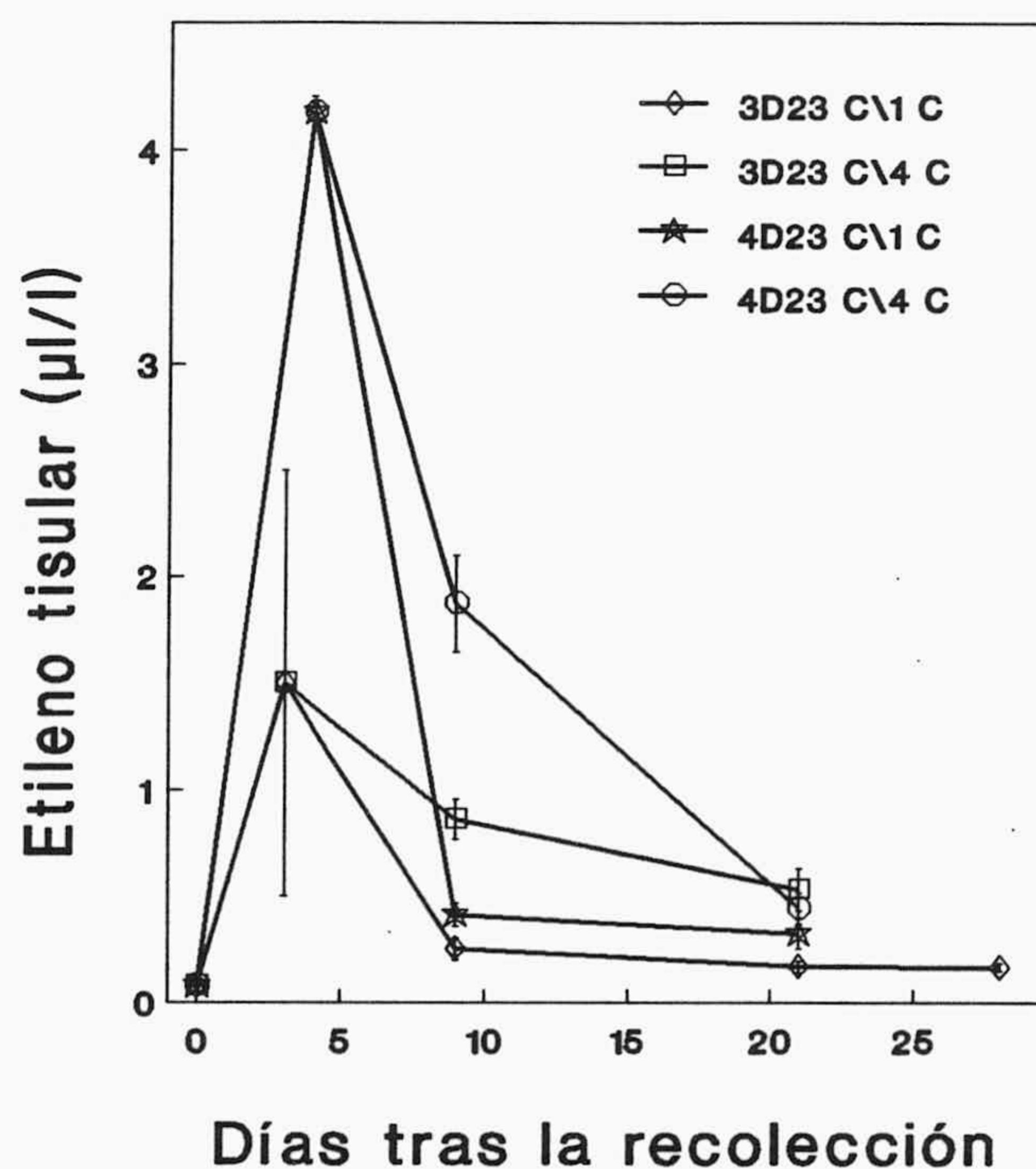


Figura 10. Evolución de los niveles de etileno tisular en frutos premadurados a 23°C y refrigerados posteriormente a 1 o 4°C. 3D23°C\1°C: frutos premadurados durante 3 días a 23°C y después refrigerados a 1°C. El resto de las condiciones sigue un criterio similar de notación.

congelación.

Se repitió el anterior experimento con frutos premadurados a 20°C y los resultados organolépticos fueron similares: los frutos refrigerados recién maduros se conservaron mejor que los plenamente maduros, y en ambos casos a 1°C mejor que a 4°C. Los parámetros físicos y fisico-químicos evolucionaron también de modo similar (figuras 12A, B y C), con pequeñas diferencias atribuibles a la diferencia de temperatura. 23 días después de ser recolectados, los frutos así conservados mostraban una calidad comparable a la de los frutos madurados en condiciones normales y sólo era visible un par deamiento del epicarpio limitado a los bordes de algunos carpelos.

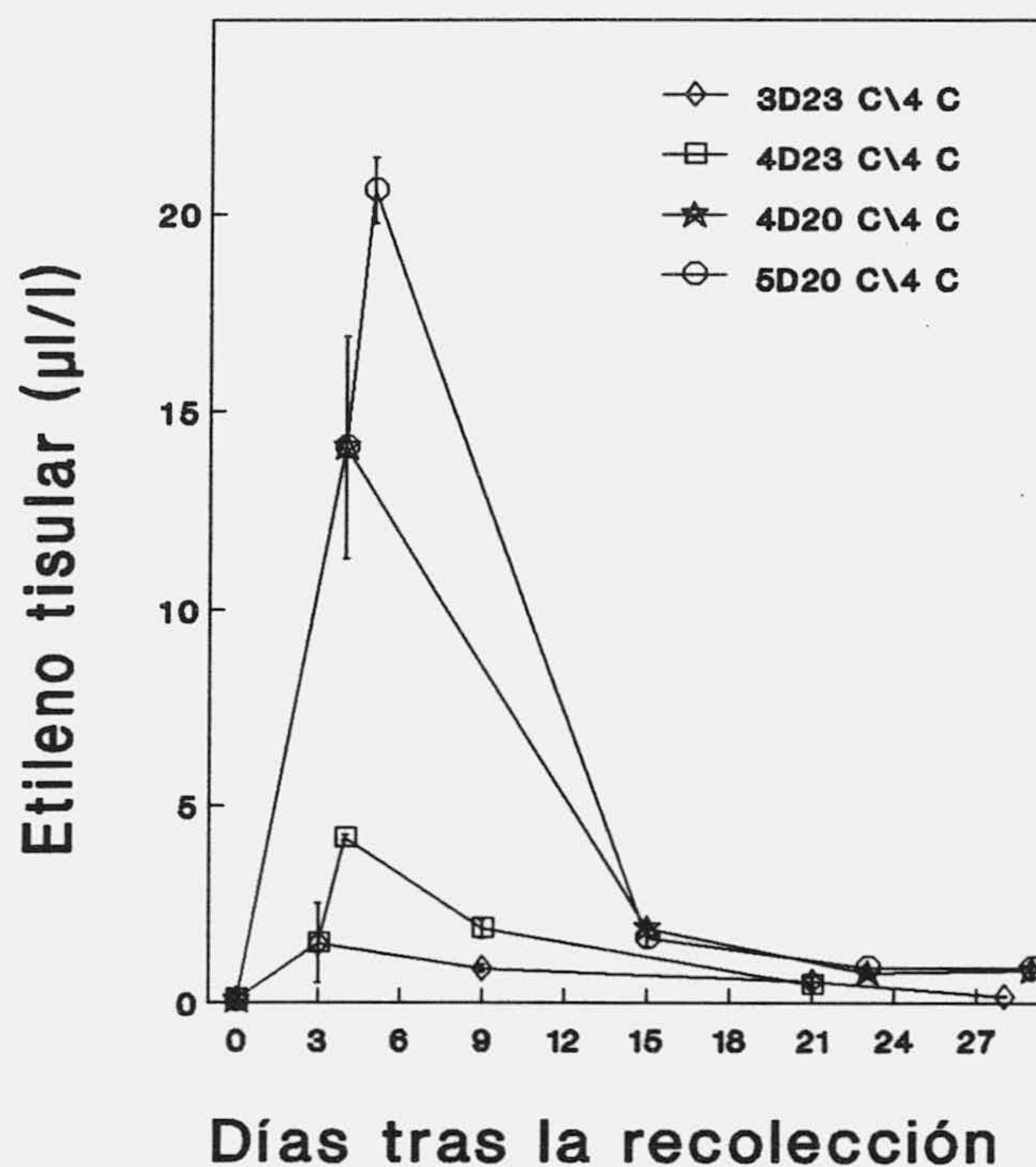


Figura 11. Evolución de los niveles de etileno tisular en frutos premadurados a 20 o 23°C y refrigerados posteriormente a 4°C. 3D23°C\4°C: frutos premadurados durante 3 días a 23°C y después refrigerados a 4°C. El resto de las condiciones sigue un criterio similar de notación.

Sin embargo, cuando estos experimentos se repitieron con frutos de distintas zonas de procedencia y recogidos en varias épocas se obtuvieron resultados muy variables, pues en muchos casos aparecieron daños por frío. Aparentemente la principal dificultad consiste en refrigerar en el instante preciso en que los frutos pierden sensibilidad a los daños por frío.

Con el objeto de poder determinar experimentalmente este instante, se decidió realizar la premaduración a 12°C. Así se pretendía ampliar el intervalo de tiempo adecuado para refrigerar a bajas temperaturas, permitiendo por tanto una mayor precisión en la determinación del momento de la pérdida de sensibilidad al frío. Los frutos refrigerados a 1 o 4°C estando aún semimaduros (80 y 90 DTR)

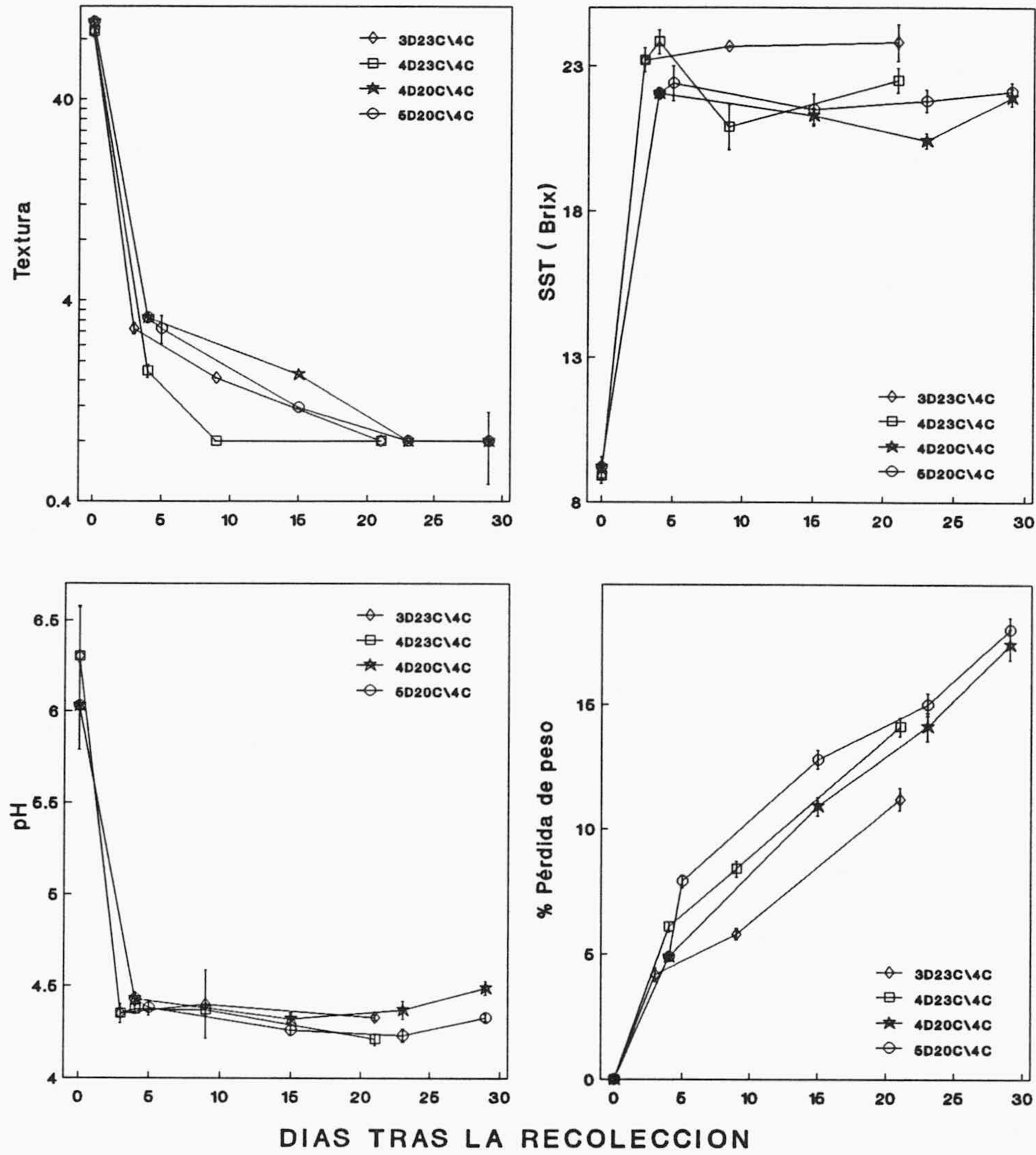


Figura 12. Evolución de distintos parámetros durante la premaduración de chirimoyas a 20 o 23°C seguida de refrigeración a 4°C. 3D23C\4C: frutos premadurados durante 3 días a 23°C y después refrigerados a 4°C. El resto de las condiciones sigue un criterio similar de notación. 12A: textura, expresada como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia. 12B: sólidos solubles totales. 12C: pH. 12D: porcentaje de pérdida de peso.

sufrieron daños por frío, pero los refrigerados a 1°C inmediatamente antes de su maduración se conservaron sin merma de calidad al menos durante 21 días después de ser recolectados. Los frutos refrigerados cuando su maduración estaba más avanzada no desarrollaron síntomas de daños por frío, pero envejecieron antes. Vázquez-Ochoa y Colinas-León (1990) han obtenido resultados similares en guayabas. Sin embargo, al realizar estos experimentos en varias ocasiones se obtuvieron resultados positivos en unos casos y frutos muy dañados en otros, del mismo modo que sucedió al premadurar a 20°C. Smock (1979) ha obtenido resultados de conservación diferentes entre frutos de la misma especie pero de cultivares distintos. En nuestro caso la variabilidad se observa dentro del mismo cultivar.

La irregularidad de los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos de premaduración seguida de refrigeración a baja temperatura desaconseja la utilización comercial de estos procedimientos.

### V.3. OTRAS TECNICAS DE CONSERVACION.

El calcio ha sido ampliamente utilizado en manzanas para retrasar la senescencia e incrementar la textura en (Poovaiah, 1986), así como en tomates para retrasar el reblandecimiento (Wills y Tirmazi, 1979), aunque otros autores no han observado que retrase el reblandecimiento en estos mismos frutos (Marangoni y Stanley, 1991). En nuestro laboratorio no hemos observado ningún efecto beneficioso del calcio sobre la conservación de las chirimoyas a 12°C. También ha sido usado para reducir la incidencia de daños por frío (Moline, 1980). La aplicación de calcio no impidió la aparición de daños por frío al refrigerar a 10°C frutos recolectados en la época temprana. Por consiguiente, su aplicación mediante inmersión no reportó ninguna ventaja para la conservación. Cabe la posibilidad de que el calcio sí ejerza algún efecto si se aplica mediante infiltración a vacío, pero este tratamiento es más agresivo (Marangoni y Stanley, 1991) y podría perjudicar la calidad de las chirimoyas.

También se ha estudiado la posibilidad de que una incubación con etileno o con Ethrel tras la refrigeración a 4°C pueda evitar la manifestación de los daños por frío (IV.3.6.). El único efecto observado ha sido un reblandecimiento más rápido de los frutos incubados con etileno, lo que parece indicar la existencia de un efecto inductor de la síntesis de hidrolasas de la pared celular por parte

del etileno en chirimoyas. No se ha observado ningún efecto del Ethrel a las dosis estudiadas. A pesar del reblandecimiento, los frutos tratados con etileno mostraron otros síntomas de haber sufrido severos daños por frío, lo que hace inútil este tratamiento.

De la Plaza (1980) ha estudiado la aplicación de las técnicas de atmósfera controlada (CA) a la conservación de las chirimoyas. El período máximo de conservación alcanzado en condiciones de CA es de 12 días. Un período similar ha sido alcanzado en nuestro laboratorio en aire atmosférico a 12°C, y se han alcanzado períodos de conservación superiores mediante refrigeración cuando la época de recolección era la adecuada. Hemos decidido desestimar la posibilidad de estudio del método de CA porque no ofrece un período de conservación más extenso que otro más simple de aplicar, como es la refrigeración simple en aire atmosférico. Por otra parte, no parece estar demostrado que los frutos hayan podido alcanzar los 12 días de conservación en CA y sigan siendo aptos para el consumo, pues se estudian parámetros analíticos y organolépticos de los frutos tras 12 días de conservación en CA, cuando los frutos aún no han madurado, pero no se estudia la calidad de los frutos una vez que terminan de madurar a temperatura ambiente. Estos hechos nos hacen pensar que probablemente sea difícil de conseguir una técnica de CA que permita conservar los frutos más de lo que ya se ha conseguido mediante refrigeración simple.

En los Antecedentes se han descrito con detalle las posibilidades que ofrece el empleo de atmósferas hipobáricas combinadas con la refrigeración en la conservación de frutos. Esta técnica también se ha aplicado a frutos tropicales como la papaya, haciendo posible un período de conservación de 22 días (Jamieson, 1980). La aplicación a las chirimoyas de un vacío parcial (70 mm Hg) combinado con la refrigeración a 10°C hizo que maduraran de modo anómalo, no siendo aptas para el consumo al incubarlas a 20°C ya desde el 9º día de conservación hipobárica. Los daños no fueron causados por la refrigeración, pues los frutos fueron recolectados en la época media y los controles a 10°C en atmósfera libre no sufrieron daños por frío. La producción de etileno se mantuvo en niveles muy bajos, en torno al 4 % de los controles, lo que demuestra que los bajos niveles de O<sub>2</sub> deprimen la biosíntesis de etileno en chirimoyas, igual que en otros frutos (Adams y Yang, 1979). Otros parámetros de maduración se comportaron de modo extremadamente anómalo: la textura no disminuyó, al menos durante 15 días; el pH no bajó de 5'5, elevándose después hasta 6'5-6'8. Ke et al. (1990) también han observado una

elevación del pH en peras mantenidas en atmósferas hipóxicas. El empleo de atmósferas hipobáricas perturbó profundamente la maduración de las chirimoyas, produciéndose una pérdida total del valor comercial de los frutos, por los que esta técnica debe ser desestimada.

Uno de los tratamientos hipobáricos incluía  $\text{KMnO}_4$  húmedo como trampa de etileno (Pech *et al.*, 1982). Al comparar el estado de estas chirimoyas con las de otro tratamiento que sólo se diferenciaba en la ausencia de  $\text{KMnO}_4$  no se observó ningún efecto del permanganato, lo que demuestra la inutilidad de su uso, al menos en estas condiciones.

El sulfito y el bisulfito sódicos no han demostrado ninguna utilidad como inhibidores del pardeamiento (IV.3.7.1. y IV.4.). El bisulfito empleado en algunos tratamientos hipobáricos ejerció un llamativo efecto incrementando los niveles de etileno tisular y disminuyendo la textura y el pH para el que no hemos encontrado explicación. Debido a su nula utilidad como inhibidores del pardeamiento, no parece provechoso su empleo comercial.

Son abundantes los trabajos publicados sobre los métodos de conservación basados en mantener los frutos en una atmósfera hipóxica a presión de 1 atm, como se ha citado en los Antecedentes de esta memoria. En nuestro laboratorio hemos estudiado los resultados de la aplicación de distintas técnicas de conservación en atmósferas hipóxicas autogeneradas, que se incluyen dentro del grupo más amplio de las atmósferas modificadas (MA). Estas técnicas han consistido en la combinación de la refrigeración a  $10^\circ\text{C}$  con el uso de frascos de vidrio herméticos, películas de polietileno de baja densidad (PEBD) de  $20\ \mu\text{m}$  con y sin cámara de aire, PEBD de  $3\ \mu\text{m}$  mono y multicapa, y recubrimientos céreos. Ninguna de las técnicas probadas ha dado resultados comercialmente interesantes. En algunas de ellas los frutos sufrían daños severos por hipoxia que les impedían madurar con normalidad, como es el caso de los frascos de vidrio herméticos, el PEBD de  $20\ \mu\text{m}$  con cámara de aire y el PEBD de  $3\ \mu\text{m}$  con 2, 3, 4 y 5 capas. En algunos de los experimentos de conservación en PEBD de  $20\ \mu\text{m}$  sin cámara de aire se obtuvieron buenos resultados de conservación durante 15 días, mientras que otros lotes de frutos tratados de modo idéntico sufrieron daños severos; esta diversidad de resultados de conservación bajo las mismas condiciones ya la habíamos observado en los experimentos de premaduración seguida de refrigeración a bajas temperaturas y creemos que puede deberse

a factores de variabilidad biológica que no controlamos. El PEBD de 3  $\mu\text{m}$  deteriora menos los frutos que los anteriores envoltorios aparentemente porque su mayor permeabilidad a los gases hace menos severas las condiciones de hipoxia a que se somete el fruto. Sin embargo, esta técnica no tiene aplicación comercial debido a la aparición de sabores anormales en la pulpa debido posiblemente a procesos fermentativos. La cera Waterwax retrasa poco la maduración de los frutos y presenta un serio inconveniente: al no poder ser eliminada con facilidad, el fruto termina de madurar a 20°C sin libre acceso al  $\text{O}_2$  y aparecen sabores anómalos en la pulpa.

Generalmente se acepta que la acumulación de productos de fermentación inducidos bajo condiciones anaeróbicas, tales como el etanol y acetaldehído, se forman a partir de metabolitos procedentes de la glucólisis y, por consiguiente, representan un desequilibrio metabólico que consiste en una disminución de la respiración y un incremento de la glucólisis (Forward, 1983). En la figura 13 se observa que los frutos con tratamientos que producen severos daños por hipoxia, como PEBD 20  $\mu\text{m}$  sin cámara de aire, presentan niveles de etanol superiores a los de frutos con daños más leves. Los valores más bajos corresponden al control refrigerado con libre acceso al aire. De acuerdo con Forward (1983), la acumulación de etanol parece ser un indicador del grado de daños por anaerobiosis a que se han sometido las chirimoyas.

En la figura 14 podemos observar que el envoltorio más restrictivo de la difusión de los gases (PEBD 20  $\mu\text{m}$ ) está asociado a una menor acumulación de etileno, probablemente debido a que mantiene una presión parcial de  $\text{O}_2$  más baja que en el resto de los tratamientos, lo que ralentiza la biosíntesis de etileno (Adams y Yang, 1979).

Los parámetros textura, SST y pH muestran que la maduración es más rápida en los frutos con libre acceso al aire (figuras 15A, B y C), mientras que en el resto se observa una evolución tanto más lenta cuanto más restringido está su acceso al  $\text{O}_2$  y la eliminación del  $\text{CO}_2$  producido. Por consiguiente, podemos afirmar que también en el caso de las chirimoyas la velocidad de maduración es tanto mayor cuanto más elevados sean los niveles de  $\text{O}_2$  y más bajos los de  $\text{CO}_2$ . El irregular comportamiento del pH y la textura de los frutos mantenidos en frascos de vidrio herméticos puede explicarse del siguiente modo: cada fruto fue encerrado en un frasco que contenía además un volumen de aire similar al del fruto. El  $\text{O}_2$  de la cámara de aire fue



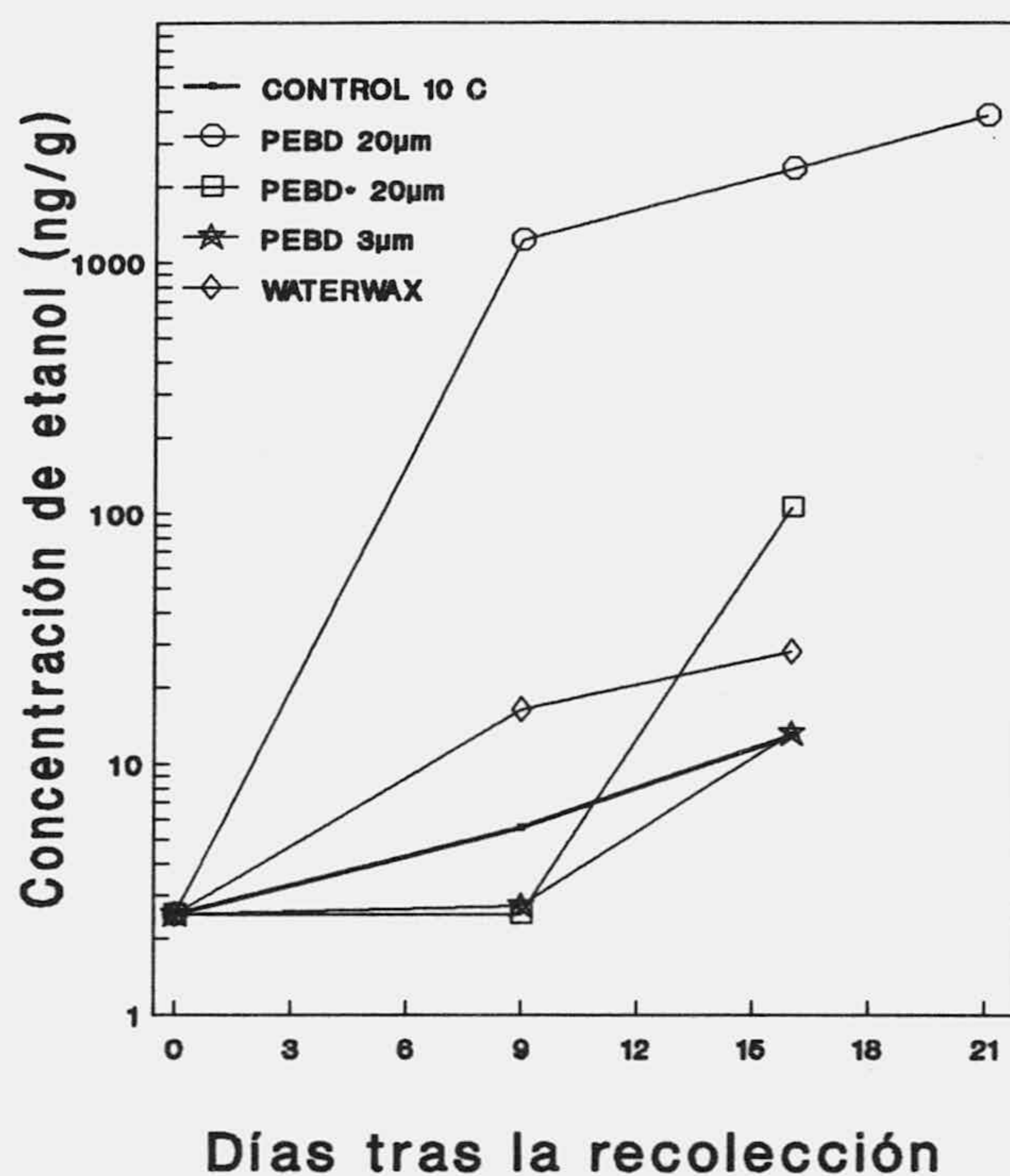


Figura 13. Evolución de los niveles de etanol en mesocarpio de chirimoyas recubiertas con distintos materiales que hacen posible la formación de atmósferas hipóxicas auto-generadas. PEBD es polietileno de baja densidad. PEBD\* indica que el envoltorio plástico incluye también una cámara de aire de 3 a 4 veces el volumen del fruto.

suficiente como para iniciar una evolución normal de estos parámetros. Sin embargo, la atmósfera progresivamente hipóxica provocó una inflexión en la evolución del pH. Este comportamiento ya se observó durante el estudio de las atmósferas hipobáricas y ha sido observado por otros investigadores (Ke *et al.*, 1990). El anómalo comportamiento de la textura es difícilmente explicable, pero probablemente se deba a cambios estructurales en los polisacáridos de la pared celular ocasionados al incrementarse el grado de disociación de sus grupos ácidos, que de este modo pueden interaccionar con cationes polivalentes. El incremento de uniones cruzadas entre macromoléculas explicaría el incremento de textura.

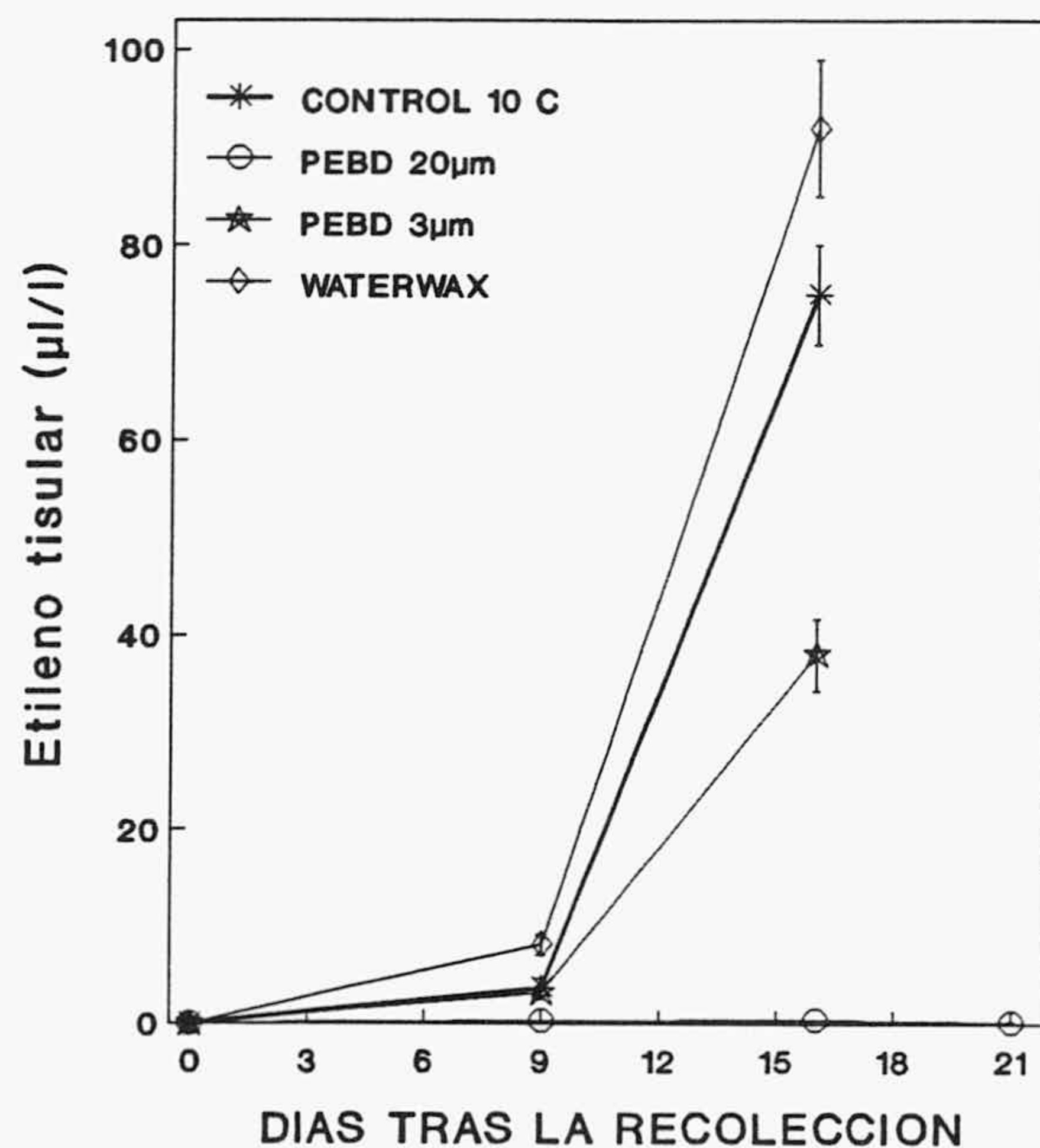


Figura 14. Evolución de los niveles de etileno tisular en chirimoyas recubiertas con distintos materiales que hacen posible la formación de atmósferas hipóxicas autogeneradas. PEBD es polietileno de baja densidad.

En cuanto a la pérdida de peso, la gran diferencia observada entre el comportamiento de los controles y los frutos envueltos se debe a que los envoltorios crean un microambiente saturado de agua que rodea al epicarpio, lo que ralentiza enormemente la transpiración del fruto (figura 15D). Probablemente también contribuya a esto la previsible disminución de la respiración del fruto en una atmósfera de bajo  $O_2$ . Esta disminución de las pérdidas de peso también se ha observado en papayas enceradas o envueltas en plástico (Paull y Chen, 1989). El encerado de los frutos podría ser útil en la disminución de las pérdidas de peso en frutos refrigerados a 10 o 12°C, pero el sabor anómalo que desarrollan los frutos al ser transferidos a 20°C lo impide.

Un hecho llamativo es que el empleo de recubrimientos progresi-

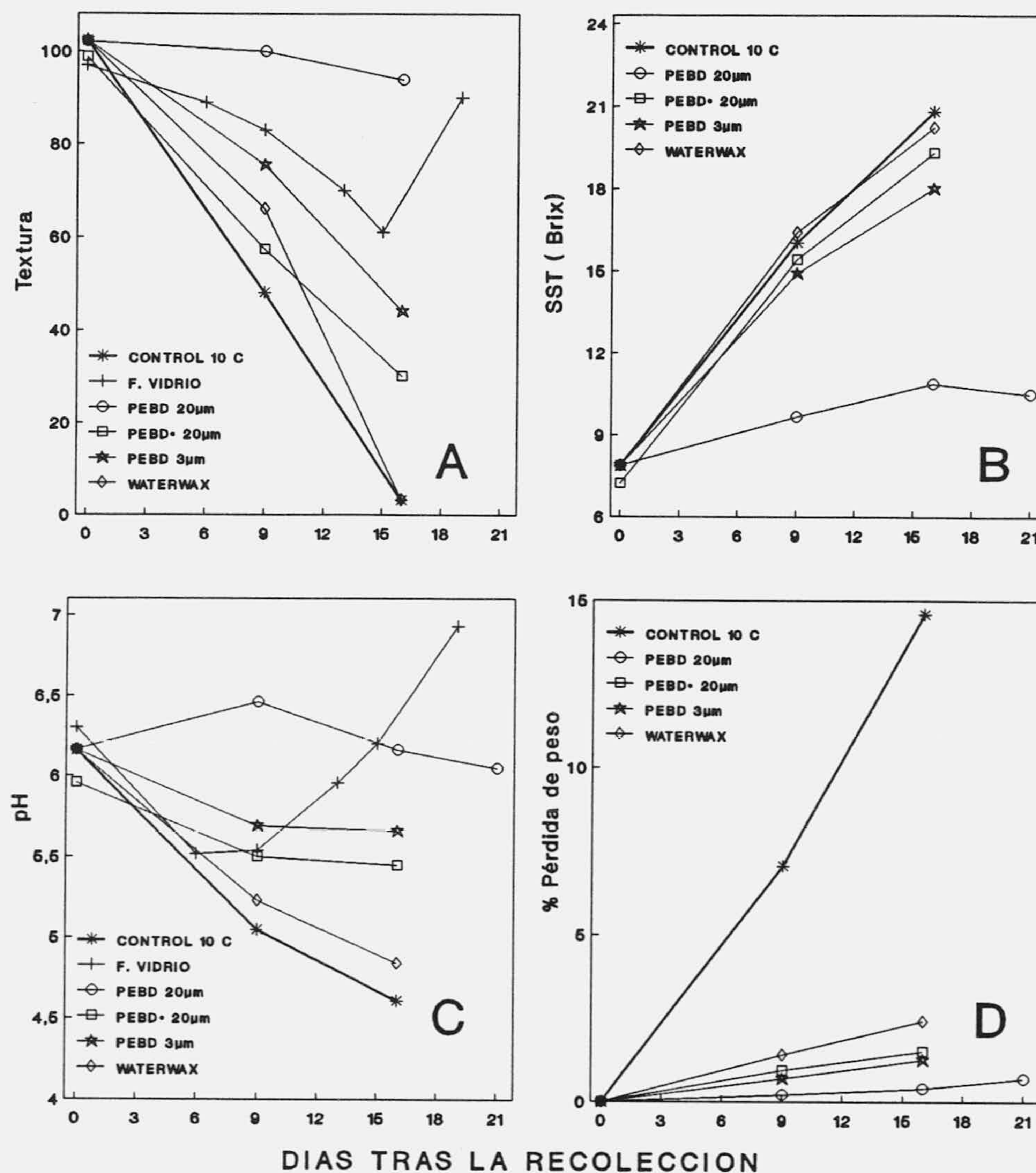


Figura 15. Evolución de distintos parámetros en chirimoyas recubiertas con distintos materiales que hacen posible la formación de atmósferas hipóxicas autogeneradas. PEBD es polietileno de baja densidad. 15A: textura, expresada como porcentaje de la textura inicial de un grupo de frutos tomados como referencia. 15B: sólidos solubles totales. 15C: pH. 15D: porcentaje de pérdida de peso. F. VIDRIO es frasco de vidrio. PEBD\* indica que el envoltorio plástico incluye también una cámara de aire de 3 a 4 veces el volumen del fruto.

vamente menos restrictivos de la difusión de los gases disminuye los daños por hipoxia e incrementa la velocidad de la evolución de parámetros de maduración tales como pH, textura y SST, pero no existen condiciones intermedias óptimas que permitan un retraso en la maduración sin la aparición de daños por hipoxia. Por consiguiente, creemos que las técnicas que emplean atmósferas hipóxicas no son adecuadas para la conservación de las chirimoyas, aunque el empleo de recubrimientos selectivos ofrece un nuevo campo de experimentación no abordado en la presente memoria.

## **CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES.

1. Se ha demostrado que la aplicación del fungicida Imazalil al 0'05 % en disolución detergente reduce la incidencia de las micosis a menos del 4 %.
2. La sensibilidad de las chirimoyas al frío depende de la época de recolección. Los frutos de la época temprana (septiembre y octubre) son más sensibles al frío que los de la época media (noviembre a febrero) debido a las condiciones ambientales en que se ha desarrollado el fruto.
3. La temperatura óptima para la refrigeración de los frutos de cualquier época sin que sufran daños por frío es 12°C. Los frutos recién recolectados y refrigerados a esta temperatura maduran 12 días después de ser recolectados, siendo aptos para el consumo durante dos días más.
4. La refrigeración de frutos de la época media a 10°C permite su conservación hasta 15-17 días tras la recolección, pero no es aplicable a frutos recolectados en la época temprana.
5. Los frutos sometidos a preenfriamiento rápido a 1°C sufren daños por frío consistentes en un pardeamiento precoz del epicarpio. Esto hace inviable la aplicación comercial de esta técnica.
6. Los frutos sometidos a refrigeración intermitente en régimen de temperaturas de 8'5°C/23°C durante un período máximo de 40 horas de refrigeración no muestran síntomas de daños por frío. El retraso observado en la maduración se corresponde con el tiempo de refrigeración a que estuvieron sometidos los frutos.
7. La premaduración a 20 o 23°C seguida de refrigeración a 1 o 4°C ha rendido resultados heterogéneos, careciendo por consiguiente de aplicación práctica.
8. El empleo de las diferentes modalidades estudiadas de recubrimientos céreos, envoltorios de PEBD, atmósfera hipóxica autogenerada en recinto hermético y atmósfera hipobáricas no es efectivo en la conservación de los frutos del chirimoyo.

## VII. REFERENCIAS.

- ABDEL-KADER A. S., MORRIS L. L. y MAXIE E. C. (1968) Physiological studies of gamma irradiated tomato fruits. I: Effects on respiratory rate, ethylene production and ripening. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 92:553-67.
- ABDEL-MAKSOUUD M. M., ABOU-AZIZ A. B., ABDEL-KADER A. S. y ABDEL-SAMIE K. A. (1974) Influence of growing season and storage temperature on chilling injury of tomato fruit. *Egyptian J. Hort.* 1:271-74.
- ABELES, F. B. (1973) *Ethylene in plant biology*, Academic Press, New York.
- ADAMS D. O. y YANG S. F. (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:170.
- ADATO I. y GAZIT S. (1977) Changes in the initiation of climacteric ethylene in harvested avocado fruits during their development. *J. Sci. Food. Agric.* 28(3):240-42.
- AHMED A. E. y LABAVITCH J. M. (1980) Cell wall metabolism in ripening fruit: I. Cell wall changes in ripening "Bartlett" pears. *Plant Physiol.* 65:1014-16.
- AKAMINE E. K. (1977) Hastening the ripening of papayas for processing. *Proc. 13th Annu. Hawaii Papaya Ind. Assn. Conf.* págs.: 32-38.
- AKAMINE E. K. Y MOY J. H. (1983) Delay in post harvest ripening and senescence of fruits. En: *Preservation of food by ionizing radiations*, vol. 3, págs.: 129-58. Eds.: E. S. Josephson, M. S. Peterson. CRC Press, Boca Ratón, Fla. USA.
- ALBERSHEIM P. (1976). *Plant Biochemistry*. (J. Bonner and J.E. Varner, eds.), 3rd ed., pp. 225-274. Academic press, New York.
- ALI Z. M. y BRADY C. J. (1982) Purification and characterization of polygalacturonase of tomato fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 9:155-69.

## REFERENCIAS

- AN J.-F. y PAULL R. E. (1990) Storage temperature and ethylene influence on ripening of papaya fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(6):949-53.
- ANGOSTO T., GONZALEZ F. y MATILLA A. (1988) Partial purification and some biochemical properties of acid phosphatase in germinating chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. *Physiol. Plant.* 74:715-19.
- AUTIO W. R. y BRAMLAGE W. J. (1986) Chilling sensitivity of tomato fruit in relation to ripening and senescence. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:201-04.
- AWAD, M. y YOUNG R. E. (1979) Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase and pectin methyl esterase in avocado (*Persea americana* Mill. cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol.* 64:306-8.
- AXELROD B. (1967) Other pathways in carbohydrate metabolism. Págs. 272-308, en *Metabolic pathways*, 3ª edición, vol. 1. Ed.: D. M. Greenberg. Academic Press, New York.
- BACIC A., HARRIS P. J., STONE B. A. (1988) Structure and function of plant cell walls. En *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, ed. J. Preiss. 14:297-371. New York: Academic. USA.
- BALDWIN E.A. y PRESSEY R. (1988) Tomato poligalacturonase elicits ethylene production in tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113:92-95
- BALDWIN E. A., NISPEROS-CARRIEDO M. O. y MOSHONAS M. G. (1991) Quantitative analysis of flavor and other volatiles and for certain constituents of two tomato cultivars during ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(2):265-69.
- BANKS N. H. (1984a) Studies of the banana surface in relation to the effects of TAL Pro-long coating on gaseous exchange. *Scientia Hortic.* 24:279-86.
- BANKS N. H. (1984b) Some effects of TAL Pro-long coating on ripening bananas. *J. Exp. Bot.* 35:127-37.



- DANKS N. H. (1984c) Responses of banana fruit to Pro-long coating at different times relative to the initiation of ripening. *Scientia Hort.* 26:149-57.
- BARMORE C. R. (1974) Ripening mangos with ethylene and ethephon. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 87:331-334.
- BARNES E. H. (1968) Botrytis diseases. En *Atlas and Manual of Plant Diseases*. Agriculture Handbook Nº 105, pág. 94. U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C.
- BARTEN J. H. M. y SCOTT J. W. (1992) Low temperatures induce rough blossom-end scarring of tomato fruit during early flower development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(2):298-303.
- BARTLEY I. M. (1976) Changes in the glucans of ripening apples *Phytochemistry* 15:625-26.
- BARTLEY I. M. y KNEE M. (1982) The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food chem.* 9:47-58.
- BATTEN D. J. (1990) Effect of temperature on ripening and postharvest life of fruit of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv. 'African Pride'. *Scientia Hort.* 45:129-136.
- BEAUDRY R. M., PAZ N., BLACK C. C. y KAYS S. J. (1987) Banana ripening: implications of changes in internal ethylene and CO<sub>2</sub> concentrations, pulp fructose 2,6-bisphosphate concentration, and activity of some glycolytic enzymes. *Plant Physiol.* 85:277-82.
- BEAUDRY R. M., SEVERSON R. F., BLACK C. C. y KAYS S. J. (1989) Banana ripening: implications of changes in glycolytic intermediate concentrations, glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. *Plant Physiol.* 91: 1436-44.
- BEAUDRY R. M., CAMERON A.C., SHIRAZI A. AND DOSTAL-LANGE D. (1992) Modified-atmosphere packaging of blueberry fruit: Effect of temperature on package O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:436-441

## REFERENCIAS

- BEN-ARIE R., KISLEV N. y FRENKEL, C. (1979) Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiol.* 64:197-202.
- BEN-ARIE R., SEGAL N. y GUELFAT-REICH S. (1984) The maturation and ripening of the 'Wonderful' pomegranate. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109(6):898-902.
- BENNETT A. B. y DELLAPENNA D. (1987) Polygalacturonase: its importance and regulation in ripening. In *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*, ed. W. W. Thompson, E. Nothnagel, R. Huffaker, págs.: 98-107. Rockville, MD: Amer. Soc. Plant Physiol. USA.
- BENNETT A. B., SMITH G. M. y NICHOLS B. G. (1987) Regulation of climacteric respiration in ripening avocado fruit. *Plant Physiol.* 83:973-76.
- BEN-YOSHUA S., KOBILER I. y SHAPIRO B. (1981) Effects of cooling versus seal-packaging with high density polyethylene on keeping qualities of various citrus cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:536-40.
- BERGMEYER H. U. y BERNT E. (1974a) Glutamate-pyruvate transaminase. UV-assay, manual method. En: *Methods of enzymatic analysis*, págs.: 752-58. Ed. H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, Inc.: New York. USA.
- BERGMEYER H. U. y BERNT E. (1974b) Glutamate-oxaloacetate transaminase. UV-assay, manual method. En: *Methods of enzymatic analysis*, págs.: 727-33. Ed. H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, Inc.: New York. USA.
- BERGMEYER H. U., GAWEHN K. y GRASSL M. (1974c)  $\beta$ -Amylase. En: *Methods of enzymatic analysis*, pág.: 433. Ed. H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, Inc.: New York. USA.
- BERGMEYER H. U., GAWEHN K. y GRASSL M. (1974d) Catalase. En: *Methods of enzymatic analysis*, págs.: 438-39. Ed. H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, Inc.: New York. USA.
- BEYER E. M. y MORGAN P. W. (1970) A method for determining the concentration of ethylene in the gas phase of vegetative plant

- tissues. *Plan Physiol.* 46:352-54.
- BIALE J. B. y YOUNG R. E. (1971) The avocado pear. En *The biochemistry of fruit and their products*, ed. A. C. Hulme, 2:1-63. London: Academic.
- BIALE J. B., YOUNG R. E. y OLMSTEAD A. J. (1954) Fruit respiration and ethylene production. *Plant Physiol.* 29:168-274.
- BLACKMAN F. F. y PARIJA P. (1928) Analytical studies in plant respiration. I. The respiration of a population of senescent ripening apples. *Proc. R. Soc. London Ser.* 103:412-45.
- BLANKENSHIP S. M. y RICHARDSON D. G. (1985) Development of ethylene biosynthesis and ethylene-induced ripening in cultivar D'anjou pears (*Pyrus communis*) during the cold requirement for ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:520-23.
- BLEINROTH E. W. (1975) Fatores que afetam a respiração das frutas e hortaliças, e o controle de CO<sub>2</sub> na câmara. *Bol. Inst. Tecnol. Alim.* Nº 44:1-37.
- BONGHI C., RASCIO N., RAMINA A. y CASADORO G. (1992) Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. *Plant Mol. Biol.* 20:839-848.
- BRADFORD M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- BRADY C. J. (1987) Fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:179-204.
- BRADY C. J., MacALPINE G., McGLASSON W. B. y UEDA Y. (1982) Polygalacturonase in tomato fruits and the induction of ripening. *Aust. J. Plant Physiol.* 9:171-78.
- BRADY C. J., McGLASSON W. B., PEARSON J. A., MELDRUM S. K. y KOPELIOVICH E. (1985) Interactions between the amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium and firmness in tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 110:254-58.
- BRADY C. J., MELDRUM S. K., McGLASSON W. B., ALI Z. M. (1983)

## REFERENCIAS

- Differential accumulation of the molecular forms of polygalacturonase in tomato mutants. *J. Food Biochem.* 7:7-14.
- BRADY C. J. y O'CONNELL P. B. H. (1976) On the significance of increased protein synthesis in ripening banana fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 3:301-10.
- BRAUNSTEIN, A. E. (1973) Amino group transfer. En *The Enzymes*, 3ª edición, vol. 9, parte B. Ed.: P. D. Boyer. Academic Press, New York.
- BRECHT P. E. (1980) Use of controlled atmospheres to retard deterioration of produce. *Food Technol.* 34(3):45-50.
- BRECHT J. K. y KADER A. A. (1984) Description and postharvest physiology of some slow-ripening nectarine genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109(5):596-600.
- BRECHT J. K.; KADER A. A., HEINTZ C. M. y NORONA R. C. (1982) Controlled atmosphere and ethylene effects on quality of California canning apricots and clingstone peaches. *J. Food Sci.* 47(2):432-36.
- BROUGHTON W. J. y TAN G. (1979) Storage conditions and ripening of the custard apple *Annona squamosa* L. *Sci. Hort.* 10:73.
- BROWN B. I. y SCOTT K. J. (1985) Cool storage conditions for custard apple fruit (*Annona atemoya* Hort.) *Singapore J. Primary Ind.* 13:23-31.
- BROWN B. I. y WILLS R. B. H. (1983) Post-harvest changes in guava fruit of different maturity. *Scientia Hortic.* 19:237-243.
- BROWN B. I., WONG L. S., GEORGE A. P. y NISSEN R. J. (1988) Comparative studies on the postharvest physiology of fruit from different species of *Annona* (custard apple). *J. Hort. Sci.* 63(3): 521-28.
- BRUNE W. y VAN LELYVELD L. J. (1982) Biochemical comparison of leaves of five avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and its possible association with susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* rootrot. *Phytopath.* 104:243-54.

- BUESCHER R. W. y HOBSON G. E. (1982) Role of calcium and chelating agents in regulating the degradation of tomato fruit tissue by polygalacturonase. *J. Food Biochem.* 6:147-60.
- BURG S. P. y BURG E. A. (1962) Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiol.* 37:179-89.
- BURG S. P. y BURG E. A. (1967) Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.* 42:144-152.
- BURG S. P. y BURG E. A. (1969) Interaction of ethylene, oxygen and carbon dioxide in the control of fruit ripening. *Qual. Plant. Mater. Veg.* 19:185.
- CAMPBELL C. A., HUBER D. J. y KOCH K. E. (1989) Postharvest changes in sugars, acids, and color of carambola fruit at various temperatures. *HortScience* 24(3):472-75.
- CARPITA N. C. (1987) The biochemistry of "growing" cell walls. En *Physiology of Cell Expansion During Plant Growth*, ed. Cosgrove D. J., Kniewel D. P. págs.: 28-45. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD. USA.
- CASAS A. (1983) Alteraciones fisiológicas en la corteza de los frutos cítricos ocasionadas por el frío, en el transporte y almacenamiento refrigerados. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 23:321-36.
- COOPER J.B., CHEN J.A. y VARNER J.E. (1984). In: *Structure, function and biosynthesis of plant cell walls*. W.M. Dugger y S. Bartnicki-García (Eds.). Waverly Press, Baltimore, MD pp.75-88.
- COREY K. A., SCHLIMME D. V. y CHANEY N. A. (1988) Changes in epicuticular wax on watermelon fruits during ripening. *HortScience* 23(4):730-31.
- COTTER R. L., MacRAE E. A., FERGUSON A. R., McMATH K. L. y BRENNAN C. J. (1991) A comparison of the ripening, storage and sensory qualities of seven cultivars of kiwifruit. *J. Hort. Sci.* 66(3): 291-300.
- COUEY H. M. y FARIAS G. (1979) Control of postharvest decay of papaya. *Hortscience.* 14:719-721.

## REFERENCIAS

- COUEY H. M. y HAYES C. F. (1986) Quarantine procedure for Hawaiian papaya using fruit selection and a two-stage hot-water immersion. *J. Econ. Entomol.* 79:1307-14.
- COUEY H. M. y OLSEN K. L. (1977) Commercial application of a pre-storage carbon dioxide treatment to retain quality in Golden Delicious apples. *Michigan State Univ. Hort. Rept.* 28:165.
- CROOKES P. R. y GRIERSON D. (1983) Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol.* 72:1088-93.
- CHAN H. T. Jr. (1988) Alleviation of chilling injury in papayas. *HortScience* 23(5):868-70.
- CHAN H. T., SANXTER S. y COUEY H. M. (1985) Electrolyte leakage and ethylene production induced by chilling injury on papaya. *HortScience* 20:1070-72.
- CHAN H. T. y TAM S. Y. T. (1982) Partial separation and characterization of papaya endo- and exo-polygalacturonase. *J. Food Sci.* 47:1478-83.
- CHAPLIN G. R. y SCOTT K. J. (1980) Association of calcium in chilling injury susceptibility of stored avocado. *HortScience* 15:514.
- CHEN N.-M. y PAULL R. E. (1986) Development and prevention of chilling injury in papaya fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:639-643.
- CHEOUR F., ARUL J., MAKHLOUF J. Y WILLEMOT C. (1992) Delay of membrane lipid degradation by calcium treatment during cabbage leaf senescence. *Plant Physiol.* 100:1656-1660.
- CHISHOLM D. N. y PICHA D. H. (1986) Effect of storage temperature on sugar and organic acid contents of watermelon. *Hortscience* 21(4):1031-33.
- CHRISTOFFERSEN R. E., TUCKER M. L. y LATIES G. G. (1984) Cellulase gene expression in ripening avocado, *Persea americana* cultivar Hass, fruit; the accumulation of messenger RNA and protein as demonstrated by complementary DNA hybridization and

- immunodetection. *Plant Mol. Biol.* 3:385-92.
- DARVILL A., McNEIL M., ALBERSHEIM P. and DELMER D.P. (1980) In *The biochemistry of plants* eds. Stumpf P.K. and Conn E.E.. Vol 1. pp. 91-162. Academic Press. New York.
- DAWSON D.M., MELTON L.D., WATKINS C.B.(1992) Cell Wall Changes in nectarines *Prunus persica*. Solubilization and depolymerization of pectic and neutral polymers during ripening and in mealy fruit. *Plant Physiol.* 100:1203-1210.
- DE LA PLAZA J. L. (1980) Controlled atmosphere storage of cherimoya. *Proc. XV Int. Cong. Refrig.*, vol. III:701-12. Venecia (1979). Italia.
- DE LA PLAZA J. L. y MERODIO C. (1987) Influencia de la absorción química de etileno en la conservación de fresón en atmósfera modificada. *Frutic. Profes.* Nº 12:60-67.
- DELHOM, M. J. (1986) La conservación frigorífica de las peras. En *Hojas divulgadoras del Mº de Agricultura, Pesca y Alimentación.* Nº 14/86 HD.
- DELLAPENNA D., ALEXANDER D. C., BENNETT A. B. (1986) Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6420-24.
- DEL RIO M. A., CUQUERELLA J., MARTINEZ-JAVEGA J. M. y NAVARRO P. (1993) Efecto de la temperatura de conservación y recubrimientos en la calidad final de mandarinas "Fortune". III *Simposio Nacional sobre maduración y postrecolección de frutos y hortalizas*, 4-05. Sevilla.
- DEWEY D. H., SARGENT S. A. y SASS P. (1985) Controlling internal breakdown in Jonathan apples by postharvest application of calcium chloride. *Res. Rpt. Michigan State Univ. Agr. Expt. Sta.* 433.
- DODDS G. T., BROWN J. W. y LUDFORD P. M. (1991) Surface color changes of tomato and other solanaceous fruit during chilling. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(3):482-90.

## REFERENCIAS

- DOWNS C. G. y BRADY C. J. (1990) Two forms of exopolygalacturonase increase as peach fruits ripen. *Plant Cell Environ.* 13:523-30.
- DROUET A. y HARTMANN C. (1982) Polyribosomes from pear fruit. II. Changes occurring in pulp tissues during ripening and senescence. *Plant Physiol.* 69:885-87.
- DURAN S. (1983a) Bitter pit. En *Frigoconservación de la fruta*, ed. Aedos. Barcelona.
- DURAN S. (1983b) Factores ambientales o ecológicos. En *Frigoconservación de la fruta*, ed. Aedos. Barcelona.
- DURAN S. (1983c) Scald. En *Frigoconservación de la fruta*, ed. Aedos. Barcelona.
- DURAN S. (1983d) Temperatura y calidad de los frutos. En *Frigoconservación de la fruta*, ed. Aedos. Barcelona.
- DURAN S. (1983e) La prerrefrigeración. En *Frigoconservación de la fruta*, ed. Aedos. Barcelona.
- DURAN S. (1983f) Las alteraciones fúngicas o podredumbres. En *Frigoconservación de la fruta*, ed. Aedos. Barcelona.
- EL-GOORANI M. A. y SOMMER N. F. (1979) Suppression of post-harvest plant pathogenesis fungi by carbon monoxide. *Phytopathol.* 69:834.
- ELKIND Y., GALPER O. B., VIDAUSKY S., SCOTT J. W. y KEDAR N. (1990) Genetic variation and heritability of blossom-end scar size in tomato. *Euphytica* 50:241-48.
- ENGLMAIER P. (1984) GC analysis of syringe-handled biological hydrocarbon gas samples (especially ethylene) using dichloromethane as internal standard. *J. Chromatogr. Sci.* 22:56-60.
- ESCRIBANO M. I. y MERODIO C. (1993) Cambio en los niveles de putrescina asociados a la maduración de la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) III Simposio Nacional sobre maduración y postrecolección de frutos y hortalizas, 2-03. Sevilla.
- EVANS C. A. (1936) Storage problems. 73rd Ann. Rpt. Nova Scotia



Fruit growers Association pág. 72.

EVANS C. A. (1953) *Scient. Agric.* 15:542.

FALLAHI E., RICHARDSON D. G. y WESTWOOD M. N. (1985) Influence of rootstocks and fertilizers on ethylene in apple fruit during maturation and storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(2):149-53.

FAROOQI W. A. (1974) Controlled atmosphere storage of fresh fruits and vegetables. *Pakistan J. Sci.* 26:92-98.

FERGUSON I. B. (1984) Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plan Cell & Environ.* 7:477-89.

FISCHER R. L. y BENNETT A. B. (1991) Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:675-703.

FORNEY CH. F. (1990) Ripening and solar exposure alter polar lipid fatty acid composition of 'Honey Dew' muskmelons. *HortScience* 25(10):1262-64.

FORSYTH F. R., EAVES C. A. y LIGHFOOT H. J. (1969) Storage quality of McIntosh apples as affected by removal of ethylene from the storage atmosphere. *Can. J. Plant Sci.* 49:567.

FORWARD D. C. (1983) Respiration: a holistic approach to metabolism. En *Plant Physiology: A Treatise*. vol. 2, cap. 4. Eds.: F. C. Steward y R. G. S. Bidwell. Academic Press, New York. USA.

FRENKEL C. y DICK R. (1973) Auxin inhibition of ripening in Bartlett pears. *Plant Physiol.* 51:6-9.

FRENKEL C. y PATTERSON M. E. (1977) Metabolis effects of CO<sub>2</sub> in Bartlett pears. *Michigan State Univ. Hort. Rept.* 28:108.

FRY S. C. (1988) *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*, ed. John Wiley & Sons. New York. USA.

FUSTER C. y PRESTAMO G. (1980) Variation of cherimoya (*A. cherimola*) texture during storage, as determined with an Instron food testing instrument. *J. Food Sci.* 45:142-45.

## REFERENCIAS

- FUCHS Y., ZAUBERMAN G., YANKO U. y HOMSKY S. (1975) Ripening of mango fruits with ethylene. *Trop. Sci.* 17:211-216.
- GIOVANNONI J. J., DELLAPENNA D., BENNETT A. B y FISCHER R. L. (1989) Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell.* 1:53-63.
- GLENN G. M., REDDY A. S. N. y POOVAIAH B. W. (1988) Effect of calcium on cell wall structure, protein phosphorylation and protein profile in senescing apples. *Plant Cell Physiol.* 29:565-72.
- GRIERSON D. y TUCKER G. A. (1983) Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. *Planta.* 157:174-79.
- GUINEL F. C. y LARUE T. A. (1992) Ethylene inhibitors partly restore modulation to pea mutant E107 (brz)<sup>1</sup>. *Plant Physiol.* 99:515-18.
- GUTIERREZ M., SOLA M. M., PASCUAL L. RODRIGUEZ-GARCIA M.I. y VARGAS A.M. (1992) Ultrastructural changes in cherimoya fruit injured by chilling. *Food Structure* 11:323-332.
- GUTIERREZ M., SOLA M. M., PASCUAL L. y VARGAS A. M. (1993) Postharvest changes of sugar concentrations in chilled-injured cherimoya (Annona cherimola Mill.) *J. Plant Physiol.* (en prensa).
- HAGENMAIER R.D. and SHAW P.E. (1992) Gas permeability of fruit coating waxes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:105-109
- HAMMER P. E., YANG S. F., REID M. S. y MAROIS J. J. (1990) Postharvest control of Botrytis cinerea infections on cut roses using fungistatic store atmospheres. *J. Amer. Soc. Hort.* 115(1):102-07.
- HARDENBURG R. E., WATADA A. E. y WANG C. F. (1986) The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. *U. S. Dep. Agric. Handb.* 66: 1.
- HARVEY T. y CHAN C. Jr. (1988) Alleviation of chilling injury in papayas. *HortScience* 23(5):868-70.

- HATFIELD R. y NEVINS D. J. (1986) Characterization of the hydrolytic activity of avocado cellulase. *Plant Cell Physiol.* 27:541-52.
- HATTON T. T. (1990) Reduction of chilling injury with temperature manipulation. En *Chilling Injury of Horticultural Crops*, págs.: 269-80. Ed.: Ch. Y. Wang, Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc. USA.
- HENZE J., PEKMEZCI M. y BAUMANN H. (1983) Effects of ethrel and ethylene on the ripening of bananas. *Acta Hort.* 138:173-77.
- HEPLER P. K. y WAYNE R. O. (1985) Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plan Physiol.* 36:397-439.
- HIRAI M. (1982) Accelerated sugar accumulation and ripening of loquat fruit by exogenously applied ethylene. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 51(2):159-64.
- HOBSON G. E. (1962) Determination of polygalacturonase in fruits. *Nature.* 195:804-05.
- HOBSON G. E. (1980) Effect of the introduction of non-ripening mutant genes on the composition and enzyme content of tomato fruit. *J. Sci. Food Agric.* 31:578-84.
- HOBSON G. E., RICHARDSON C. y GILLHAM D. J. (1983) Release of protein from normal and mutant tomato cell walls. *Plant Physiol.* 71:635-38.
- HOFFMAN N. E. y YANG S. F. (1982) Enhancement of wound-induced ethylene synthesis by ethylene in preclimacteric cantaloupe. *Plant Physiol.* 69:317-322.
- HOPKIRK G., BEEVER D. J. y TRIGGS C. M. (1986) Variation in soluble solids concentration in kiwifruit at harvest. *New Zealand J. Agric. Res.* 29:475-84.
- HOPKIRK G., SNELGAR W. P., HORNE S. F. y MANSON P. J. (1989) *J. Hort. Sci.* 64(2):227-37.
- HORTON B. D. (1992) Ripening patterns within a peach as indicated by force and soluble solids concentrations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(5):784-87.

## REFERENCIAS

- HUBER D. J. (1983) The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Hortic. Rev.* 5:169-219.
- HUBER D.J. (1984) Strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit softening, the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *J. Food Sci.* 49:1310-1315.
- IKI K., SEKIGUCHI K., KURATA K., TADA T., NAKAGAWA H., *et al.* (1978) Immunological properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from ripening fruit. *Phytochemistry* 17:311-12.
- INABA A. y NAKAMURA R. (1981) Ripening characteristics of Japanese apricot (mume, *Prunus mume* Sieb. et Zucc.) fruits on and off the tree. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 49(4):601-07.
- INABA A., OKAMOTO I., ITO T. y NAKAMURA R. (1984) Ripening characteristics of commercial 'Cavendish' bananas attached on the plant in the Philippines, and those harvested at different maturities and transported to Japan. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 53(1):66-78.
- ITO T. y NAKAMURA R. (1984) The effect of fluctuating temperature on chilling injury of several kinds of vegetables. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 53(2):202-09.
- JACKMAN R. L., GIBSON H. J. y STANLEY D. W. (1992) Effects of chilling on tomato fruit texture. *Physiol. Plantarum* 86:600-08.
- JAMIESON W. J. (1980) Use of hypobaric conditions for refrigerated storage of meats, fruits, and vegetables. *Food Technol.* 34(3):64-71.
- JEFFERY D.C., SMITH C., GOODENOUGH P., PROSSER I. and GRIERSON D. (1984) Ethylene-independent and ethylene-dependent biochemical changes in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 74:32-38.
- KADER A. A. (1980) Prevention of ripening in fruits by use of controlled atmospheres. *Food Technol.* 34(3):51-54.
- KADER A. A., MORRIS L. L. y KLAUSTERMEYER J. A. (1977) Physiological responses of some vegetables to carbon monoxide. *Michigan State Univ. Hort. Rept.* 28:197.

- KADER A. A., CHASTAGNER G. A., MORRIS L. L. y OGAWA J. M. (1978) Effects of carbon monoxide on decay, physiological responses, ripening, and composition of tomato fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103:665.
- KADER A. A. y MORRIS L. L. (1977) Relative tolerance of fruits and vegetables to elevated CO<sub>2</sub> and reduced O<sub>2</sub> levels. *Michigan State Univ. Hort. Rept.* 28:260.
- KAHN V. (1975) Polyphenol oxydase activity and browning of three avocado varieties. *J. Sci. Fodd Agric.* 26:1319.
- KATO K., ABE K. y SATO R. (1977) The ripening in apple fruits. I. Changes in respiration, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> evolution and internal C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> concentration during maturation and ripening. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 46(3):380-88.
- KE D., VAN GORSEL H. y KADER A. A. (1990) Physiological and quality responses of 'Bartlett' pears to reduced O<sub>2</sub> and enhanced CO<sub>2</sub> levels and storage temperature. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(2):435-39.
- KE L.-H. y KE T.-F. (1980) Studies on the ripening of bananas. 2. Effects of elevated temperature and lower ethylene concentration on the ripening of bananas. *J. Agr. Assn. China.* 112:36-43.
- KEEGSTRA K., TALMADGE K.W., BAUER W.D. and ALBERSHEIM P. (1973) Structure of plant cell walls. III. Model of the walls of suspension culture sycamore cells based on the interconections of the macromolecular components *Plant. Physiol.* 51:188-196
- KING J. (1974) 6-Phosphogluconate dehydrogenase. En: *Methods of enzymatic analysis*, págs.: 632-35. Ed. H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, Inc.: New York. USA.
- KLEIN J. D. (1989) Ethylene biosynthesis in heat treated apples. En: *Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants*, págs.: 181-89. Eds.: H. Clijters. Kluwer Press, Dordrecht.
- KLEIN J. D., LURIE S. y BEN-ARIE R. (1990) Quality and cell wall components of 'Anna' and 'Granny Smith' apples treated with

## REFERENCIAS

- heat, calcium, and ethylene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(6):954-58.
- KNEE M. y BARTLEY I. M. (1981) Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. En: *Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables*, ed. J. Friend, M. J. C. Rhodes, págs.: 133-48. London: Academic. UK.
- KNEE M. y BARTLEY I.M. (1982) In *Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables*. ed. Friend J. and Rhodes M.J.C. pp.131-146. Academic Press. New York. USA.
- KNEE M., STOW J. R. y WATT J. B. (1975) Ethylene removal during storage of apples at various oxygen concentrations. *East Malling Res. Sta. Ann. Rept.*, pág 79.
- KOCH J. L. y NEVINS D. J. (1989) Tomato fruit cell wall. I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethyl esterase to identify developmental changes in pectins. *Plant Physiol.* 91: 816-22.
- KOSIYACHINDA S. y YOUNG R. E. (1975) Ethylene production in relation to the initiation of respiratory climacteric in fruit. *Plant Cell Physiol.* 16:595-602.
- KRAMER G. F. y WANG C. Y. (1989) Reduction of chilling injury in zucchini squash by temperature management. *HortScience* 24(6):995-96.
- KRAMER G.F., WANG C. Y. y CONWAY (1991) Inhibition of softening by polyamine application in "Golden Delicious" and "McIntosh" apples. *J. Amer. Soc. Sci.* 116:813-817
- KRAMER G.F., WANG C. Y. y CONWAY W.S. (1989). Correlation of reduced softening and increased polyamine levels during low-oxygen storage of "MsIntosh" apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*
- LABAVITCH J.M. (1981) Cell wall turnover in plant development. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 32:385-406.
- LAFUENTE M. T., BELVER A., GUYE M. G. y SALTVEIT M. E. Jr. (1991) Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 95:443-49.

- LAMPORT D. T. A. (1986) The primary cell wall: a new model. In *Cellulose: Structure, Modification and Hydrolysis*, ed. Young R. A. y Rowell, R. M. págs.: 77-90. New York: John Wiley & Sons. USA.
- LARRIGAUDIÈRE C., LATCHE A., PECH J. C. y TRIANTAPHYLIDES C. (1991) Relationship between stress ethylene production induced by gamma irradiation and ripening of cherry tomatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(6):1000-03.
- LARUE T. A. G. y GAMBORG O. L. (1971) Ethylene production by plant cell cultures. *Plant Physiol.* 48:394-98.
- LEHLE F. R. (1991) Ethanolic fermentation in hypoxic cotton seed. *Crop Sci.* 31:746-50.
- LEOPOLD A. C. (1975). Aging, senescence and turnover in plants. *BioScience* 25:659-62.
- LESTER G. E. y DUNLAP J. R. (1985) Physiological changes during development and ripening of 'Perlita' muskmelon fruits. *Sci. Hort.* 26:323-331.
- LIDSTER P. D. (1990) Storage humidity influences fruit quality and permeability to ethane in 'McIntosh' apples stored in diverse controlled atmospheres. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(19:94-96.
- LIEBERMAN M (1979) Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:533-91.
- LINCOLN J. E. y FISCHER R. L. (1988) Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Mol. Gen. Genet.* 212:71-75.
- LIPTON W. J. (1975) Controlled atmospheres for fresh vegetables and fruits.-Why and when. En *Symposium: postharvest biology and handling of fruits and vegetables*. Ed. N. F. Haard y D. K. Salunkhe. págs.: 130-144 Avi Pub. Co., Inc., Westport, Connecticut-USA.
- LIU F. W. (1977) The ethylene problem in apple storage. *Michigan State Univ. Hort. Rept.* 28:26.

## REFERENCIAS

- LÖHR G. W. y WALLER H. D. (1974) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. En: **Methods of enzymatic analysis**, págs.: 727-33. Ed. H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, Inc.: New York. USA.
- LOOMIS W. D. (1974) Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymol.** XXXI:528-544.
- LOPEZGOMEZ R. y GOMEZLIM M. A. (1993) Changes in mRNA and protein synthesis during ripening in mango fruit. **J. Plant Physiol.** 141:82-87.
- LURIE S. (1992) Controlled atmosphere storage to decrease physiological disorders in nectarines. **Int. J. Food Sci. Tec.** 27:507-514.
- LYONS J. M. (1973). Chilling injury in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 24:445.
- LYONS J. M., McGLASSON W. B. y PRATT H. K. (1962) Ethylene production, respiration, & internal gas concentrations in cantaloupe fruits at various stages of maturity. **Plant Physiol.** 37:31-36.
- MARANGONI A. G. y STANLEY D. W. (1991) Studies on the long-term storage of mature, green tomato fruit. **J. Hort. Sci.** 66(1):81-84.
- MAREI N. y CRANE J. C. (1971) Growth and respiratory response of fig (*Ficus carica* L. cv. Misson) fruits to ethylene. **Plant Physiol.** 48:249-54).
- MARTINEZ-CAYUELA M., FAUS M. J. y GIL A. (1988) Effects of some reductants on the activity of cherimoya polyphenol oxidase. **Phytochemistry** 27(6):1589-92.
- MATSUMOTO S., OBARA T. y LUH B. S. (1983) Changes in chemical constituents at kiwifruit during post-harvest ripening. **J. Food Sci.** 48:607-11.
- MAUDE R. B. (1980) Disease control. En: **The biology of Botrytis**. Eds.: J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff y W. R. Jarvis. London:



Academic. UK.

- MAXIE E. C., JOHNSON C. F., BOYD C., RAE H. L. y SOMMER N. F. (1966) Effect of gamma irradiation on ripening and quality of nectarines and peaches. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 89:91-99.
- McCOLLUM T. G., HUBER D. J. y CANTLIFFE (1989) Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiol. Plant.* 76:303-308.
- McDONALD R. E. (1989) Temperature-conditioning affects polyamines of lemon fruits stored at chilling temperatures. *HortScience* 24 (3):475-77.
- McGLASSON W. B. (1985) Ethylene and fruit ripening. *HortScience* 20:51-54.
- McGLASSON W. B. y LEE T. E. (1971) Damage and repair of protein in gamma irradiated tomato fruit. *Radiation Bot.* 11:239-41.
- McGLASSON W. B. y PRATT H. K. (1964) Effects of wounding on respiration and ethylene production by cantaloupe fruit tissue. *Plant Physiol.* 39:128-32.
- McGLASSON W. B. y PRATT H. K. (1964) Effects of ethylene on cantaloupe fruits harvested at various ages. *Plant Physiol.* 39:120-27.
- McMURCHIE E. J., McGLASSON W. B. y EAKS I. L. (1972) Treatment of fruits with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237:235-36.
- McNEIL M., DARVILL A.G., FRY S.C. y ALBERSHEIM P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53:625-663.
- MEDLICOTT A. P., N'DIAYE M. y SIGRIST J. M. M. (1990a) Harvest maturity and concentration and exposure time to acetylene influence initiation of ripening in mangos. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(3):426-30.
- MEDLICOTT A. P., SIGRIST J. M. M. y SY O. (1990b) Ripening of mangos following low-temperature storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*

## REFERENCIAS

115(3):430-34.

- MILLER A., BONNER J. y BIALE J. B. (1953) The climacteric rise in fruit respiration as controlled by phosphorylative coupling. *Plant Physiol.* 28:521-31.
- MILLER W. R. y RISSE L. A. (1986) Film wrapping to alleviate chilling injury of bell peppers during cold storage. *Hort-Science*, 21:467.
- MITCHAM E.J. y McDONALD R.E. (1992) Cell Wall modification during ripening of Keitt and Tommy Atkins mango fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sc.* 117:919-924.
- MIZRAHI Y., DOSTAL H. y CHERRY J. (1975) Ethylene-induced ripening in attached 'rin' fruits, a non-ripening mutant of tomato. *HortScience* 10:414-15.
- MOLINE H. E. (1980) Effects of vacuum infiltration of calcium chloride on ripening rate and chilling injury on tomato fruit. *Phytopathology* 70:691.
- MONTERO L. M., ZAMORANO J. P. y MERODIO C. (1993) Modificación de proteínas relacionadas con maduración. Efecto de las bajas temperaturas de conservación. III Simposio Nacional sobre maduración y postrecolección de frutos y hortalizas, 4-14. Sevilla.
- MORGAN P. W. (1969) Stimulation of ethylene evolution and abscission in cotton by 2-chloroethanephosphonic acid. *Plant Physiol.* 44:337-41.
- MORRIS L. L. (1982) Chilling injury of horticultural crops: an overview. *HortScience* 17:161-62.
- MOWLAH G. y ITOO S. (1983) Changes in pectic components, ascorbic acid, pectic enzymes and cellulase activity in ripening and stored guava. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 30:454-461.
- MURATA T. (1969) Physiological and biochemical studies of chilling injury in bananas. *Physiol. Plant.* 22:401.
- NAHIR D. y BEN-YOSHUA S. (1977) Fruit wrapping machine. Israeli patent Nº 52.125.

- NAKAMURA R., FUJII S., INABA A. e ITO T. (1986) Effect of weight loss prior to cold storage on chilling sensitivity in eggplant fruit. *Sci. Rep. Fac. Agric. Okayama Univ.* 68:19-25.
- NAKAMURA R., FUJII S., INABA A. e ITO T. (1987) Effects of different soil moisture and fertilizer application during cultivation on chilling sensitivity after harvest in eggplant fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 55:490-97.
- NAKAMURA R., INABA A. e ITO T. (1985) Effect of cultivating conditions and postharvest stepwise cooling on the chilling sensitivity of eggplant and cucumber fruits. *Sci. Rep. Fac. Agric. Okayama Univ.* 66:19-29.
- NOODEN L. D. y LEOPOLD A. C. (1978). Phytohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission. In *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*. (D. S. Letham, P. B. Goodwin, and T. J. V. Higgins, eds.), Vol. 2, pág. 329-69. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- OLIAS J. M., SANZ L. C., RIOS J. J., VERDIER M. y PEREZ A. G. (1993) Efecto del material del envase sobre la vida útil comercial del fresón. III Simposio Nacional sobre maduración y postrecolección de frutos y hortalizas, 4-06. Sevilla.
- PALIYATH G. y POOVAIAH B. W. (1985) Calcium- and calmodulin-promoted phosphorylation of membrane protein during senescence in apples. *Plant Cell Physiol.* 26:977-86.
- PANTASTICO E. B., GRIERSON W. y SOULE J. (1967) Chilling injury in tropical fruits. I. Bananas (*Musa paradisiaca* var *Sapientum* cv. Lacatan). *Proc. Trop. Reg. Amer. Soc. Hort. Sci.* 11:83.
- PATIL S. S. y TANG C. (1974) Inhibition of ethylene evolution in papaya pulp tissue by benzyl isothiocyanate. *Plant Physiol.* 53:585-88.
- PAULL R. E. (1982) Postharvest variation in composition of soursop (*Annona muricata* L.) fruit in relation to respiration and ethylene production. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107(4):582-85.
- PAULL R. E. (1990) Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. En *Chilling Injury of Horticultural Crops*,

## REFERENCIAS

- págs.: 17-36. Ed.: Ch. Y. Wang, Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc. USA.
- PAULL R.E. and CHEN N.J. (1983) Postharvest variation in cell wall degrading enzymes of papaya during fruit ripening. *Plant Physiol.* 72:382-385.
- PAULL R. E. y CHEN N. J. (1989) Waxing and plastic wraps influence water loss from papaya fruit during storage and ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:937-42.
- PAULL R. E., DEPUTY J. y CHEN N. J. (1983) Changes in organic acids, sugars and head space volatiles during fruit ripening of soursop. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108:931-34.
- PAULL R. E. y ROHRBACH K. G. (1985) Symptom development of chilling injury in pineapple fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:100.
- PECH J. C., LATCHE A., FALLOT J. y LURTON L. (1982) Product enabling breakdown of ethylene present in fruit preservation enclosures. *Assoc. Rech. Developp. l'Amelior. Plant. Nouvel. Technol.* Centre d'Experimentations Fruits et Legumes, France. N° FR 2 509 964.
- PESIS E., FUCHS Y. and ZAUBERMAN G. (1978) Cellulase and softening in avocado. *Plant Physiol.* 61:416-419
- PLATT-ALOIA K. A. y THOMSON W. W. (1981) Ultrastructure of the mesocarp of mature avocado fruit and changes associated with ripening. *Ann. Bot.* 48:451-65.
- PLATT-ALOIA K. A., THOMSON W. W. y YOUNG R. E. (1980) Ultrastructural changes in the walls of ripening avocados: transmission, scanning and freeze fracture microscopy. *Bot. Gaz.* 141:366-73.
- POOVAIAH B. W. (1986) Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. *Food Techn.* 40:86-89.
- POOVAIAH B.W. and WUKSYZ A. (1979) Polygalacturonase and cellulase enzymes in the normal Rutgers mutant 'rin' tomato fruits and their relationship to the respiratory climateric. *Plant Physiol.* 64:534-537.

- POSTLMAYR H. L., LUH B. S. y LEONARD S. J. (1966) Characterization of pectic changes in freestone and clingstone peaches during ripening and processing. *Food Tech.* 10:618-25.
- PRATT H. K. y GOESCHL J. D. (1969) Physiological roles of ethylene in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20:541-84.
- PRATT H. K. y WORKMAN M. (1962) Studies on the physiology of tomato fruits. III. The effect of ethylene on respiration and ripening behavior of fruits stored at 20°C after harvest. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 81:467-78.
- PRESSEY R. y AVANTS J. J. (1973a) Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiol.* 52:252-56.
- PRESSEY R. y AVANTS J. K. (1973b) Two forms of polygalacturonase in tomatoes. *Biochim. Biophys. Acta* 309:363-69.
- PRESSEY R. y AVANTS J. K. (1982) Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonases: effects of pectinesterases. *J. Food Biochem.* 6:57-74.
- PRESSEY R., HINTON D. M. y AVANTS J. K. (1971) Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectins in peaches during ripening. *J. Food Sci.* 36:1070-73.
- PRETEL M. T., SERRANO M., AMOROS A., ROMOJARO F. y RIQUELME F. (1993) Conservación de dos variedades de albaricoque en atmósferas modificadas. III Simposio Nacional sobre maduración y postrecolección de frutos y hortalizas, 4-02. Sevilla.
- PROCTOR F. J. y CAYGILL J. C. (1985) Ethylene in commercial postharvest handling of tropical fruits, en: *Ethylene and plant development*. Ed: J. A. Roberts y G. A. Tucker, págs. 317-32. Butterworths, London. UK.
- PUSCHMANN R., KE D. y ROMANI R. (1985) Ethylene production by suspension-cultured pear fruit cells as related to senescence. *PlantPhysiol.* 79:973-76.
- RAGOTHAMA K. G., VELUTHAMBI K. y POOVAIAH B. W. (1985) Regulation of protein phosphorylation by calcium and polyamines in developing

## REFERENCIAS

- tomato fruits. *Plant Physiol.* 77S:4 (resumen).
- RANWALA A. P., SUEMATSU CH. y MASUDA H. (1992) The role of  $\beta$ -galactosidases in the modification of cell wall components during muskmelon fruit ripening. *Plant Physiol.* 100:1318-25.
- REDGWELL R. J., MELTON L. D. y BRASCH D. J. (1992) Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) *Plant Physiol.* 98:71-78.
- RICHARDSON D. G. y AL-ANI A. M. (1982) Calcium and nitrogen effects on d'Anjou pear fruit respiration and ethylene evolution. *Acta Hortic.* 124:195-201.
- RICHMOND A. y BIALE J. B. (1966) Protein and nucleic acid metabolism in fruits. I. Studies of amino acid incorporation during the climacteric rise of avocado. *Plant Physiol.* 41:1247-53.
- RICHMOND A. y BIALE J. B. (1967) Protein and nucleic acid metabolism in fruits. II. RNA synthesis during the respiratory rise of the avocado. *Biochim. Biophys. Acta* 138:625-27.
- RISSE L. A., BRECHT J. K., SARGENT S. A., LOCASCIO S. J., CRALL J. M., ELMSTROM G. W. y MAYNARD D. N. (1990) Storage characteristics of small watermelon cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(3):440-43.
- RISSE L. A. y MILLER W. R. (1983) Effect of scrubbing ethylene during storage of tomatoes. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 96:322-24.
- ROMANI R. J., YU I. K., KU L. L. FISHER L. K. y DEHGAN M. (1968) Cellular senescence, radiation damage to mitochondria, and the compensatory response in ripening pear fruits. *Plant Physiol.* 43:1089-96.
- SACHER J. A. (1973) Senescence and postharvest physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:197-224.
- SAFTNER R.A. y BALDI B.G. (1990). Polyamine levels and tomato fruit development: Possible interaction with ethylene. *Plant Physiol.* 92:547-550

- SAKAI S. e IMASEKI H. (1973) Properties of the proteinaceous inhibitor of ethylene synthesis. Action on ethylene production and indoleacetylaspargate formation. *Plant Cell Physiol.* 14:881-92.
- SAKS Y., SONEGO L. y BEN-ARIE R. (1990) Senescent breakdown of 'Jonathan' apples in relation to the water-soluble calcium content of the fruit before and after storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(4):615-18.
- SALTVEIT M. E. (1980) Effect of vitamine K<sub>5</sub> and menadione on ripening, and ethylene and carbon dioxide production by apple and tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105(2):252-56.
- SALTVEIT M. E. y CABRERA R. M. (1987) Tomato fruit temperature before chilling influences ripening after chilling. *HortScience* 22(3):452-54.
- SALTVEIT M. E. Jr. y MORRIS L. L. (1990) Overview of chilling injury of horticultural crops. En *Chilling Injury of Horticultural Crops*, págs.: 3-15. Ed.: Ch. Y. Wang, Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc. USA.
- SCOTT K. J., McGLASSON W. B. y ROBERTS E. A. (1968) Ethylene absorbent increases storage life of bananas packed of banas packed in polyethylene bags. *Agric. Gaz. N. S. W.* 79:52.
- SCOTT K. J., McGLASSON W. B. y ROBERTS E. A. (1970) Potassium permanganate as an ethylene absorbent in polyethylene bags to delay ripening of banas during storage. *Aust. J. Exp. Agric. & Anim. Husb.* 10:237-240.
- SCOTT K. J. y ROBERTS E. A. (1966) Polyethylene bags to delay ripening of bananas during transport and storage. *Aust. J. Exp. Agric. & Anim. Husb.* 6:197-99.
- SCHWARTZ D. (1991). Comparación de proporciones de grupos independientes. En *Métodos estadísticos para médicos y biólogos*. Ed. Herder. Barcelona.
- SEYMOUR G. B., LASSLETT Y., TUCKER G. A. (1987) Differential effects of pectolytic enzymes on tomato polyuronides in vivo and in vitro. *Phytochemistry.* 26:3137-39.

## REFERENCIAS

- SHERMAN M. y ALLEN J. J. (1981) Blossom-end disorders of Florida tomatoes. *Proc Fla. State Hort. Soc.* 94:283-84.
- SHIGEURA G. T. y BULLOCK R. M. (1976) Production of guava (Psidium guajava L.) in Hawaii. *Fruit Var. J.* 4:98-100.
- SISLER E. C. y BLANKENSHIP S. M. (1993) Effect of diazocyclopentadiene on tomato ripening. *Plant Growth Regulation* 12:155-60.
- SMOCK R. M. (1979) Controlled atmosphere of fruits. *Hort Rev.* 1:301.
- SOKAL R. R. y ROHLF F. J. (1969). Estadística descriptiva. En *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*, H. Blume Ediciones. Madrid.
- SOLA M. M., GUTIERREZ M., PASCUAL L. y VARGAS A. M. (1993) Regulation of hexose phosphate cycling determines glucose and fructose accumulation in cherimoya (Annona cherimola Mill.) during ripening. *Plant Physiol.* (enviada).
- SOLOMOS T. (1983) Respiration and energy metabolism in senescing plant tissues. En *Post-Harvest Physiology and Crop Improvement*, ed. M. Lieberman, págs.: 61-98. New York.
- SOLOMOS T. y LATIES G. G. (1973) Cellular organization and fruit ripening. *Nature* 245:390-92.
- SORIA Y., RECASENS I. y VENDRELL M. (1993) Evaluación de calidad de manzanas 'Granny Smith' durante la frigoconservación, tratadas en postcosecha con diversos productos antioxidantes. III Simposio Nacional sobre maduración y postrecolección de frutos y hortalizas, 4-07. Sevilla.
- SPEIRS J., BRADY C. J., GRIERSON D. y LEE E. (1984) Changes in ribosome organization and messenger RNA abundance in ripening tomato fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 11:225-34.
- STREIF J. (1978) Effect of ethylene on ripening apples in controlled atmosphere storage. *Gartenbauwissenschaft.* 43(2):54-58.
- TAKATA M. (1981) Effect of silver ions on the ripening of Japanese persimmon fruits. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 50:372-78.



- TANG C. (1971) Benzyl isothiocyanate of papaya fruit. *Phytochemistry* 10:117-121.
- TERAI H. y MIZUNO S. (1981) The influence of ethylene, oxygen, and carbon dioxide on the maturation of bananas and satsuma mandarin fruits. *Sci. Rept. Fac. Agric., Kobe Univ.* 14(2):287-92.
- THEMMER A. P. N., TUCKER G. A. y GRIERSON D. (1982) the degradation of isolated tomato walls by purified polygalacturonase in vitro. *Plant Physiol.* 60:122-24.
- THOMAS P. (1988) Radiation preservation of food of plants origin. Part 6. Mushrooms, tomatoes, minor fruits and vegetables, dried fruits and nuts. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 24:313-58.
- TIGCHELAAR E.C., McGLASSON W.B. y FRANKLIN M.J. (1978) Natural and ethephon-stimulated ripening of F<sub>1</sub> hybrids of the ripening inhibitor (rin) and non-ripening inhibitor (nor) mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*) *Austral. J. Plant. Physiol.* 5:449-456
- TONUTTI P., CASSON P. y RAMINA A. (1991) Ethylene biosynthesis during peach fruit development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(2):274-79.
- TUCKER G. A. y GRIERSON D. (1982) Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening. *Planta* 155:64-67.
- TUCKER G. A. y GRIERSON D. (1987) Fruit ripening. En *The biochemistry of plants*. Vol. 12: 265-318. Ed.: Academic Press, Inc. Ltd. London.
- TUCKER M. L. y LATIES G. G. (1984) Interrelationship of gene expression, polysome prevalence, and respiration during ripening of ethylene and/or cyanide-treated avocado fruit. *Plant Physiol.* 74:307-15.
- TUCKER G. A., ROBERTSON N. G. y GRIERSON D. (1980) Changes in polygalacturonase isoenzymes during the 'ripening' of normal and mutant tomato fruit. *Eur. J. Biochem.* 112:119-24.
- URBAIN W. M. (1986) Fruits, vegetables and nuts. En: *Food*

## REFERENCIAS

Irradiation, págs.: 170-216. Ed.: B. S. Schweigert. Academic. New York. USA.

- VAN LEEMPUT L., MEULDERMANS W., WOESTENBORGHES R., HENDRICKX J., HENDRIKS R. y HEYKANTS J. (1986) Post-harvest treatment of apples with Imazalil: fate of the fungicide during fruit storage and juice production. *Drug Develop. Res.* 8:333-39.
- VARNER J. E. y LIN L.-S. (1989) Plant cell wall architecture. *Cell* 56:231-39.
- VAZQUEZ-OCHOA R. I. y COLINAS-LEON M. T. (1990) Changes in guavas of three maturity stages in response to temperature and relative humidity. *HortScience* 25(1):86-87.
- VENDRELL M. (1969) Reversion of senescence: effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and indole acetic acid on respiration, ethylene production and ripening in banana fruit slices. *Aust. J. Biol. Sci.* 22:601-10.
- VENDRELL M. (1985a) Effect of abscisic acid and Ethephon on several parameters of ripening in banana fruit tissue. *Plant Sci.* 40:19-24.
- VENDRELL M. (1985b) Dual effect of 2,4-D on ethylene production and ripening of tomato fruit tissue. *Physiol. Plant.* 64:559-63.
- WADE N.L., KAVANAGH E.E., HOCKLEY D.G. y BRADY C.J. (1992) Relationship between softening and the polyuronides in ripening banana fruit. *J. Sci. Food Agric.* 60:61-68.
- WANG C.Y. (1988). Changes in polyamine content in chinese cabbage during storage in air or low oxygen atmosphere. *J. Food Quality* 11:289-302
- WANG C. Y. y ADAMS D. O. (1982) Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol.* 69:424-27.
- WANG C. Y. y BAKER J. E. (1979) Effects of two free radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumber and sweet pepper fruits. *Plant Cell Physiol.* 20:243.

- WANG C.Y. y KRAMER G.F (1988). Effect of low oxigen storage on chilling injury and polyamines in zucchini squash. *Scientia Hort.* 39:1-7
- WANG C. Y., KRAMER G. F., WHITAKER B. D. y LUSBY W. R. (1992) Temperature preconditioning increases tolerance to chilling injury and alters lipid composition in Zucchini squash. *J. Plant Physiol.* 140:229-35.
- WATADA A. E., HERNER R. C., KADER A. A., ROMANI, R. J. y STABY G. L. (1984) Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *HortScience* 19:20-21.
- WELLS J. M. (1972) Heated wax emulsions with Benomyl and 2,6-dichloro-4-nitroaniline for control of postharvest decay of peaches and nectarines. *Phytopathology* 62:129-133.
- WILLS R. B. H. y TIRMAZI S. I. H. (1979) Effect of calcium and other minerals on ripening of tomatoes. *Aust. J. Plant Physiol.* 6:221-30.
- WOODRUFF R. E. (1977) Use of carbon monoxide in modified atmospheres for fruits and vegetables in transit. *Michigan State Univ. Hort. Rept.* 28:52.
- YANG S. F. (1981) Biosynthesis of ethylene and its regulation. En: *Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables.* Eds.: J. Friend y M. J. C. Rhodes. Academic Press: London.

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de la fecha, constituido por:

- D. Fernán Sánchez de Medina Canteras
- D. Carmen Aluch Pla
- D. Félix Ransojano Aluche
- D. Jose de Favre Mossup
- D. Manuel Martínez Cayrebe

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado D. JOSE MANUEL LAHOZ GARZON

se acordó por unanimidad otorgar la calificación de Aptos "cum laude"

y para que conste, se extiende firmada por componentes del Tribunal, la presente diligencia.

Granada, a 10 de Septiembre de 1993

El Secretario,

El Presidente,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Royas

[Signature]

[Signature]