

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**INSTITUTO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
PARA EL DESARROLLO**

|



**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
LA DETECCIÓN DE CAMBIOS METABÓLICOS
FRENTE A SITUACIONES DE ESTRÉS EN FRUTA
FRESCA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Lcda. Dafna Stern Freifeld

Dirigida por:

Dra. M^a. Dolores Ortolá Ortolá

Dr. Pedro Fito Maupoey

Valencia 2005



**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

D^a MARÍA DOLORES ORTOLÁ ORTOLÁ, CATEDRÁTICA Y D. PEDRO FITO MAUPOEY, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.

CONSIDERAN: que la memoria titulada **DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE CAMBIOS METABÓLICOS FRENTE A SITUACIONES DE ESTRÉS EN FRUTA FRESCA** que presenta **D^a Dafna Stern Freifeld** para aspirar al grado de Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia y que ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia, reúne las condiciones adecuadas para constituir su Tesis Doctoral, por la que **AUTORIZAN** a la interesada para su presentación.

Febrero del 2005, Valencia

Fdo.: María Dolores Ortolá Ortolá

Directora de Tesis

Fdo.: Pedro Fito Maupoey

Director de Tesis

A mis
amados padres
Dieter y Felicia
y
a mi
querido hermano
Gabriel

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores de Tesis, Dra. M^a Dolores Ortolá y Dr. Pedro Fito Maupoey por su constante e inmenso apoyo, orientación y dirección durante todo este largo proceso. Gracias Loles y Pedro! Muchas!

Al Departamento de Tecnología de Alimentos (DTA) de la Universidad Politécnica de Valencia por haberme aceptado como doctorando en el mismo en 1999. Especialmente al Prof. Pedro Fito Maupoey, entonces su Director y a la Prof. M^a Dolores Ortolá, actual Directora, por los apoyos logísticos, económicos y científicos que me han hecho posible llegar a esta etapa. Muchas Gracias!

A los profesores, doctorandos, becarios, estudiantes, proyectandos, técnicos, personal de limpieza y administrativos del DTA por su cálida y atenta colaboración en estos cinco años. Muchas gracias, muchísimas!

A la Universidad Politécnica de Valencia, a través de D. Francisco Morán, por su gran ayuda logística inicial. Gracias!

A Luis Brotons, por haberme sugerido en 1998, en la Oficina de la Fundación UPV de Montevideo, Uruguay, realizar un Doctorado en el DTA de la Universidad Politécnica de Valencia por mi interés en la Tecnología de Alimentos. Y por haber colaborado en la presentación inicial al mismo. Muchas Gracias Luis!

A Ana Andrés por su atención hacia mis interrogantes previas sobre los cursos ofertados por el DTA, mis e-mails y llamadas telefónicas y por su cálido recibimiento en este Departamento hace cinco años, junto a Maite Chafer. Muchas Gracias Ana y Maite!

Al Vicerrectorado de Tercer Ciclo de la Universidad Politécnica de Valencia por haberme exonerado del pago de la matrícula de los cursos de Doctorado. Muchas Gracias!

A Pedro Fito Suñer por su paciencia e intensa colaboración durante todo este largo proceso de elaboración de Tesis. Muchas Gracias Pedrojo!

A Eugenia, por su inmenso y constante respaldo en contestarme, ayudarme, aclararme dudas y en prestarme gentilmente el portátil para escribir mi Tesis. Gracias Eu! Millones!

A Nuria Navarrete por su enorme apoyo siempre y por su orientación en el estudio de los análisis de textura. Muchas Gracias Nuria!

A Amparo Chiralt, por su amparo constante, orientación y enseñanza de algunos puntos que contiene esta Tesis. Gracias muchas Amparo!

A Pedro García de la Fundación UPV por haber realizado la gestión de que se me otorgara una beca de la Generalitat Valenciana a través de la Fundación

UPV de manutención de tres meses durante el 2004 para continuar con la escritura de mi Tesis. Muchas Gracias Pedro!

A Ana Sanchis de la Fundación UPV por su excelente labor administrativa en la gestión de dicha beca.

A Lorena Gallart por haber colaborado intensa y personalmente para lograr que yo pudiera recibir dicha beca y por haberme enseñado a editar fotos. Muchísimas Gracias Lore!

A Miguel Angel Del Río del IVIA por su apoyo durante la escritura de mi Tesis, en aclararme dudas y brindarme material bibliográfico. Gracias Miguel Angel!

A Creu, por su enorme, constante y cálida ayuda: dudas de excell, de word, diseño de gráficas, por la traducción de mi resumen de Tesis al valenciano, etc. *Moltes Gracies, Creu!*

A Lucía, por su constante e inmenso apoyo siempre y por su enorme paciencia en contestarme preguntas de excell, de word, de diseño, de fórmulas. *Moltes Gracies, Lucía!*

A Laura Oliver, por su paciente y firme apoyo en la impresión de mi Tesis a depositar! Gracias Laura! *Moltes Gracies.*

A Ana Heredia por su constante buena onda siempre y apoyo. Gracias Anita!

A Miguel Sierra por su constante apoyo y excelente buena onda siempre! Gracias Miguel!

A Catarina por su gran apoyo en la etapa inicial en el manejo del micro cromatógrafo de gases, sistema de análisis; bibliografía y dudas sobre el programa excell. Muchas Gracias!

A Carolina, por su apoyo constante y firme durante la escritura de mi Tesis. Gracias Carola, muchas!

A Laura Pérez por su constante apoyo y enseñanzas siempre, aquí en Valencia y desde México. Gracias Lali!

A Clara Pastor por su constante ayuda y buena disposición siempre y por el gesto de haberme cedido su ordenador asignado en el Cubito para escribir mi Tesis en mejores condiciones. Muchas Gracias Clarina!

A Ana Albors, por su enorme apoyo en el montaje experimental, análisis de datos, nociones de estadística y por su buena onda y disposición siempre. Gracias Anita!

A Felipe Aunión, por su enorme colaboración, paciencia y buena onda siempre. Muchas Muchas Gracias Felipe!

A José Ignacio por su apoyo moral constante en la escritura de mi Tesis. Gracias!

A José Luis Gómez, por su lectura crítica de parte de la Introducción General, por enseñarme algunos aspectos de los cítricos y su buena onda. Muchas gracias José Luis!

A Manolo Zarzo por su paciencia y siempre buena disposición en aclarar, ayudar y enseñar estadística. Gracias Manolo, muchísimas!

A Cristina Barrera por su excelente buen ánimo siempre, buena voluntad y disposición de contestar dudas sobre excell, word, bibliografía. Gracias Cris!

A Cristina Bilbao por su cálido recibimiento el primer día que llegué al DTA y por la ayuda, compañerismo y colaboración recibida siempre. Gracias Cris! Muchas!

A Sneyder por su cálido recibimiento el primer día que llegué al DTA y por la ayuda, compañerismo y colaboración recibida siempre. Gracias Sneyder! Muchas, muchas!

A Gloria Ruiz por su cálido recibimiento y apoyo desde que llegué al DTA. Muchas Gracias Gloria!

A Soraya por la ayuda que muchas veces me brindó en algunas gestiones técnicas y de cálculos. Gracias Soraya!

A Marisa Castelló, por sus enseñanzas en estadística y su excelente buena disposición y sentido de compañerismo siempre. Gracias Mari!

A Puri por su paciencia en la etapa inicial en el tema del micro cromatógrafo y los flujómetros. Gracias Puri!

A Pau por su orientación y enseñanza del uso del texturómetro y su aporte en la discusión del tema de la ecuación de Henry. Muchas Gracias, Pau!

A Juan Bautista por su apoyo en el manejo del autoclave y orientación en algunas técnicas microbiológicas. Muchas Gracias, Bat!

A Raúl por su buena onda y orientación en el formato de escritura de la Tesis. Gracias Raúl!

A Ruth por su buena onda, sentido del humor y orientación en la enseñanza del método de desplazamiento de agua de Mohsenin. Muchas Gracias, Ruth!

A Lorena Atares por su colaboración en el tema de textura y su excelente buena onda siempre. Gracias Lore!

A Paco Escriche por sus enseñanzas del programa word, algunos elementos de estadística y su excelente buena onda. Gracias Paco!

A Asela por su cálido apoyo moral y buena onda siempre, siempre. Gracias Aselina!

A Diego por el excelente material bibliográfico que me proporcionó y por la buena onda siempre. Muchas gracias, Diego!

A Adriana por su constante buena onda. Gracias Adriana!

A Maida por su apoyo moral constante y su buena disposición en ayudar siempre. Gracias Maida!

A Angel por su buen humor siempre. Gracias Angel(ito)!

A Eva García por su apoyo de buena sintonía. Gracias Eva!

A Bernardette por su buena onda siempre. Gracias Det!

A Marc Le Maguer por sus sugerencias respecto a la preparación del documento de Tesis y la exposición oral. *Thank you Marc!*

A Ramón Catalá del IATA por su apoyo en la orientación de algunos aspectos del montaje del sistema de análisis y por su buena onda y disposición en aclarar dudas. Muchas Gracias, Ramón!

A Valeria del Valle del IATA por explicar su montaje experimental. Gracias Vale!

A Enrique Moltó del IVIA por aclararme algunas dudas sobre los impactos mecánicos y por haberme proporcionado material bibliográfico sobre sensores e impactos. Muchas Gracias Enrique!

A Juan Tuset del IVIA y a su grupo por la gentileza de sus enseñanzas en la preparación de los medios de cultivos para los *Penicillium*. Muchas Gracias!

A la Colección Española de Cultivos Tipo (CETC) por su gentileza en brindar sus cepas liofilizadas para realizar los ensayos de inoculación, así como a su personal técnico por sus enseñanzas en la reconstitución de los mismos. Muchas gracias!

A Laura Ocaña de la CETC por su gentileza en realizar una observación crítica de fotos de los cultivos obtenidos a partir de la reconstitución de los liófilos puros. Muchas Gracias Laura!

A Luis Puente por su buena onda siempre y su orientación en la búsqueda de liófilos puros en la CETC. Muchas Gracias Luis!

A Ricardo Villalobos y su familia por su excelente apoyo, compañerismo y buena disposición siempre. Muchísimas Gracias Ricardo y familia!

A Mixael por su enorme ayuda y apoyo moral durante este proceso. Muchas Gracias Mixa!

A Antonio Vega por su buena onda siempre. Gracias Antonio!

A Virginia Larrea por su apoyo moral constante en la etapa de escritura de Tesis. Muchas Gracias Virginia!

A Isabel Pérez por su gentileza y buena disposición en aclararme unas dudas sobre la bioquímica del fruto. Muchas Gracias Isabel!

A Marisa y Daniel Vidal por su buena disposición y buen humor siempre. Muchas Gracias!

A Sofia Dimitropulu por su apoyo siempre y excelente compañerismo. *Efgaristo* Sofía!

A Gema por su cálido recibimiento cuando llegué al DTA Gracias Gema!

A Clara Rosado por su cálido recibimiento cuando llegué al DTA y por su apoyo moral constante. Gracias Clarita!

A Gloria Roig por su buena onda y apoyo en este proceso. Gracias Gloria!

A Ory Ramón del Technion, Israel, por su apoyo humano y científico constante. *Todah rabah Ory!*

A Marcos Maarabi, Gran Rabino de la Comunidad Israelita del Uruguay, por sus enseñanzas y aclaraciones respecto al texto sobre el *Etrog* del *Talmud*. *Todah Rabah Moti!*

A Manuel Agustí, por haberme proporcionado gentilmente material bibliográfico sobre producción de cítricos en España. Muchas gracias!

A la Universidad Internacional Menéndez Pelayo - Valencia por haberme proporcionado gentilmente material bibliográfico sobre producción internacional de cítricos.

A J. Codina de URUD'OR Uruguay por el material bibliográfico y comentarios sobre la realidad citrícola uruguaya. Muchas Gracias!

A A. Pastore de URUD'OR Uruguay por su relato de la gestión de los cítricos uruguayos de exportación para evitar al máximo la ocurrencia de infecciones fúngicas en destino. Muchas Gracias!

A E. Falchi de PREDEG sobre los datos de patologías en manzanas y la situación frutícola en Uruguay. Muchas Gracias!

A Arturo por su apoyo constante y paciencia en aspectos informáticos y de modelos matemáticos. Muchas Gracias Arturo!

A Xue por haberme proporcionado gentilmente el programa del diccionario digital y por su buena onda siempre. Gracias Xue!

A Juan Romero por su apoyo constante y paciencia en temas informáticos e impresora. Gracias Juan!

A Chelo González por su buena disposición en su orientación en algunos puntos sobre la interpretación de gráficas de textura. Muchas Gracias Chelo!

A Myrna por sus reflexiones científicas sobre mi Tesis que me ayudaron mucho. Gracias Myrna!

A Alicia, la madre de Myrna por su buena onda y apoyo cotidiano como fue brindarme comida casera. Muchas Gracias Alicia!

A Alicia Namesny de Horticultura por su apoyo logístico durante muchas etapas de mi Tesis y por prestarme su escanner! Gracias Ali!

A Alberto Yuste por su apoyo constante durante mi Tesis. Muchas Gracias Alberto!

A Germán Ceballos por su ayuda en temas informáticos y su excelente disposición. Muchísimas Gracias, Germán!

A María Vargas por su buena onda, excelente disposición y ayuda en estadística. Gracias María!

A Alfonso Navarro por su buena disposición en facilitarme material bibliográfico y orientarme en el tema de la estequiometría de la fermentación alcohólica. Muchas Gracias Alfonso!

A Alfredo Ayala por su apoyo al comienzo de este proceso. Muchas Gracias!

A Lola, Ana Alvaruiz, Merche, Juan y Rafa, por la buena onda y excelente disposición siempre en las gestiones solicitadas. Muchas Gracias a todos y todas!

A Rosa por su excelente buena onda y apoyo moral siempre. Muchas Gracias Rosa!

A Tere por su cálido apoyo y muy buena onda siempre. Muchas Gracias Tere!

A Cristina Puig y familia por su cálido e invaluable apoyo al comienzo de mi estadía en esta ciudad. Muchas Muchas Gracias a todos!

A Isabel por su ayuda inicial en la búsqueda de piso en Valencia! Muchas Gracias Isabel!

A F. Silva por haberme proporcionado datos de cítricos exportados por Uruguay en el 2004. Muchas Gracias Fernando!

A A. Gravina de la UROU por los datos proporcionados de producción de cítricos uruguayos en el 2003. Muchas Gracias!

A B. Guarinoni (†) por los datos proporcionados en 2001 sobre las variedades de cítricos que se producen en el Uruguay.

“EL Etrog”- Cidro o Toronja (*Citrus medica* L.)

Dime, ¿qué árbol produce una fruta de tal belleza que sólo el árbol mismo puede superarla en su belleza?

¿Puede que sea el granado? No. Aunque su fruto sea encantador, el árbol es feo.

¿Puede que sea el algarrobo? No. Aunque sus hermosas ramas proporcionen una sombra refrescante, el fruto es feo.

Sin embargo el fruto del cidro y su árbol se igualan por su belleza.



Fragmento escaneado del *Talmud* de Jerusalén, Tratado de *Sucá*, Cap. III, *Halajá* 5 (*Guemará*). El texto sobre el *Etrog* (*Citrus medica* L.) arriba presentado, traducido al castellano, (delimitado por el recuadro en el texto original escaneado) escrito en idioma hebreo, está redactado por *Rabbi Yohanan bar Nappaha*, eminente sabio *emoraíta* de la Tierra de Israel de la 2ª Generación, iniciador del *Talmud* de Jerusalén, quien murió en el año 278 e. c. (año 4039 del calendario hebreo). El *Talmud* de Jerusalén se terminó de redactar en el año 500 e. c.

"Lo que digo no lo digo como hombre sabedor, sino buscando junto con vosotros", Platón (427 – 347 a. c.).



DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Tesis Doctoral

DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE CAMBIOS METABÓLICOS FRENTE A SITUACIONES DE ESTRÉS EN FRUTA FRESCA

RESUMEN

En este estudio se plantea el desarrollo de métodos analíticos para la detección de cambios metabólicos a corto plazo frente a situaciones de estrés en fruta fresca, como son las infecciones fúngicas y los impactos mecánicos.

A pesar de las modernas técnicas que se aplican actualmente en las líneas de manipulación en cítricos en postcosecha y del uso de fungicidas, continúa siendo muy frecuente la aparición de infecciones fúngicas en las frutas almacenadas, por germinación de esporas de mohos en la corteza de los cítricos favorecidas muchas veces por las heridas o magulladuras que se producen en las frutas por impactos ocurridos durante su manipulación.

Dichas infecciones tradicionalmente se hacen evidentes por la detección de signos visuales de infección en la corteza de los cítricos ("podrido") con la consecuente pudrición de las frutas afectadas, depreciación del producto y en muchos casos, la imposibilidad de su comercialización.

Dada esta situación se consideró de interés desarrollar métodos que pudieran colaborar en la predicción de la aparición de infecciones fúngicas por detección de cambios metabólicos antes que las mismas fueran evidentes y de esta manera contribuir al desarrollo de sistemas para la optimización de las etapas de comercialización.

La detección de cambios metabólicos se orientó hacia el análisis de tasas respiratorias, así como la eventual aparición de volátiles indeseables (acetaldehído y etanol).

Se ha diseñado e implementado un sistema de análisis de tasas respiratorias mediante cromatografía gaseosa del espacio de cabeza. Para ello se conectó un microcromatógrafo de gases (mCG) a una cámara de respiración hermética conteniendo la fruta a estudiar que analiza el espacio de cabeza por aspiración automática de muestras gaseosas de manera casi continua a tiempos prefijados y con tiempos cortos de análisis. El sistema se desarrolló con naranjas sanas var. Navelate. Posteriormente se aplicó en naranjas var. Navelate inoculadas con esporas de los hongos que habitualmente causan mayores perjuicios económicos en los cítricos (género *Penicillium*) almacenadas a 21°C y 75,5% u 85% HR y en manzanas var. Granny Smith impactadas mecánicamente en condiciones controladas, simulando posibles golpes que las frutas reciben en los almacenes. Los inóculos fúngicos provenían de cultivos generados a partir de liófilos puros obtenidos de la "Colección Española de Cultivos Tipo".

Se plantea un modelo matemático que simula los flujos gaseosos que se producen en el sistema a los efectos de cuantificar la tasa respiratoria y los volátiles indeseables detectados en cada análisis.

Los resultados permiten correlacionar las tasas respiratorias obtenidas con los signos visuales de infección, resultando posible detectar aumentos en la respiración previo a la detección de signos visuales de infección en todas las naranjas analizadas, siendo más agresivo el tratamiento con *P. digitatum* a 75,5% HR. En las manzanas no se detectaron cambios en las tasas respiratorias, lo que no ha sido posible correlacionar con otros cambios fisicoquímicos en la fruta (parámetros de color, textura y contenido de sólidos solubles totales).

Con estos datos preliminares, esta metodología podría constituirse en una línea interesante a continuar profundizando para la predicción de infecciones fúngicas y la detección de impactos mecánicos y consecuentemente para la optimización de la vida útil de fruta fresca.

Palabras Clave: Cítricos, cromatografía gaseosa, tasas respiratorias, *Penicillium* sp., impactos mecánicos



DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Tesis Doctoral

DESENVOLUPAMENT DE MÈTODES ANALÍTICS PER A LA DETECCIÓ DE
CANVIS METABÒLICS ENFRONT A SITUACIONS D'ESTRÈS EN FRUITA
FRESCA

RESUM

En aquest estudi es planteja el desenvolupament de mètodes analítics per a la detecció de canvis metabòlics a curt termini en front a situacions d'estrès en fruita fresca, com són les infeccions fúngiques i els impactes mecànics.

A pesar de les modernes tècniques que s'apliquen actualment en les línies de manipulació en cítrics en poscollita i de l'ús de fungicides, continua sent molt freqüent l'aparició d'infeccions fúngiques en les fruites emmagatzemades, per germinació d'espores de fongs en la corfa dels cítrics afavorides moltes vegades per les ferides o colps que es produeixen en les fruites per impactes ocorreguts durant la seva manipulació.

Estes infeccions tradicionalment es fan evidents per la detecció de signes visuals d'infecció en la corfa dels cítrics ("podrit") amb la conseqüent putrefacció de les fruites afectades, depreciació del producte i en molts casos, l'impossibilitat de la seua comercialització.

Donada aquesta situació es va considerar d'interès el desenvolupar mètodes que pogueren col·laborar en la predicció de l'aparició d'infeccions fúngiques per detecció de canvis metabòlics abans que aquestes foren evidents i d'aquesta manera contribuir al desenvolupament de sistemes per a l'optimització de les etapes de comercialització.

La detecció de canvis metabòlics es va orientar cap a l'anàlisi de taxes respiratòries mitjançant cromatografia gasosa de l'espai de capçalera. Per fer això es va connectar un microcromatògraf de gasos (mCG) a una cambra de respiració hermètica contenint la fruita a estudiar que analitza l'espai de capçalera per aspiració automàtica de mostres gasoses de manera gairebé continua a temps prefixats i en temps curts d'anàlisi. El sistema es va desenvolupar amb taronges sanes var. Navelate. Posteriorment es va aplicar a taronges var. Navelate inoculades amb espores dels fongs que habitualment causen majors perjudicis econòmics en els cítrics (gènere *Penicillium*) emmagatzemades a 21°C i 75,5% o 85% HR i en pomes var. Granny Smith impactades mecànicament en condicions controlades, simulant possibles colps que les fruites reben als magatzems. Els inòculs fúngics provenien de cultius generats a partir de liòfils purs obtinguts de la "Colección Española de Cultivos Tipo".

Es planteja un model matemàtic que simula els fluxos gasosos que es produeixen en el sistema als efectes de quantificar la taxa respiratòria i els volàtils indesitjables detectats en cada anàlisi.

Els resultats permeten correlacionar les taxes respiratòries obtingudes amb els signes visuals d'infecció, resultant possible detectar augments en la respiració previs a la detecció de signes visuals d'infecció en totes les taronges analitzades, sent més agressiu el tractament amb *P. Digitatum* a 75,5% HR. En les pomes no es van detectar canvis en les taxes respiratòries, el que no ha estat possible correlacionar amb altres canvis fisicoquímics en la fruita (paràmetres de color, textura i contingut de sòlids solubles totals).

Amb aquestes dades preliminars, aquesta metodologia es podria constituir en una línia interessant per a continuar aprofundint en la predicció d'infeccions fúngiques i la detecció d'impactes mecànics i conseqüentment per a l'optimització de la vida útil de fruita fresca.

Paraules clau: Cítrics, cromatografia gasosa, taxes respiratòries, *Penicillium sp.*, impactes mecànics.



DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Doctoral Thesis

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR METABOLIC CHANGES
DETECTION IN FRESH FRUITS UNDER STRESS CONDITIONS

ABSTRACT

This study deals with the development of analytical methods for metabolic changes detection in short time terms upon stress conditions in fresh fruits such as fungal infection and mechanical impacts.

Although modern post harvest techniques that are carried out nowadays and fungicides application in citric fruits in the manipulation lines, fungal infections occurrence are still very frequent in stored fruits through moulds spores germination in the citric fruits peel. This process is many times favoured by wounds and bruises produced in fruits due to mechanical impacts occurred during their manipulation.

Such infections are detected traditionally by visual signs on citric fruits peel ("decay") with consequent damage and complete decay of affected fruits; reduced price products and in many cases, no commercialization possibilities.

Taking into account this situation, methods development that may collaborate in fungal infections prediction occurrence through metabolically changes detection prior to fungal infection evidence was considered of interest. And in this way be able to contribute for the development of optimization commercialization steps systems.

Metabolic changes detection was oriented towards respiration rate analysis as well as the eventual occurrence of given off volatiles (acetaldehyde and ethanol).

A head space gas chromatography analysing system was designed and implemented. For this purpose, a micro gas chromatograph (mCG) was connected to a hermetic respiration chamber containing the fruit to be analysed by automatic aspiration of gas samples in an almost continuous way at a prefixed time intervals and short time of analysis. The system was developed with fresh oranges var. Navelate. Afterwards, it was applied to oranges var. Navelate inoculated with spores from moulds that habitually cause the highest economically damage in citric fruits (*Penicillium* genus) stored at 21°C and 75,5% RH or 85% RH and also in Granny Smith apples mechanically injured in controlled conditions, simulating possible mechanical impacts that fruits may receive in stores. Fungal *inoculums* came from cultures generated from pure lyophilised cultures obtained from the "Spanish Type Culture Collection".

A mathematical model that simulates the produced gas fluxes in the system is outlined in order to quantify the respiration rate and given off volatiles detected in each analysis.

Results let correlate obtained respiration rates with fungal infection visual signs, being possible to detect increases in respiration rates prior visual infection signs detection in all analysed oranges, being more aggressive the *P. digitatum* treatment at 75,5% HR. In apples no respiration rates changes were detected which did not let correlacionate with other physicochemical changes in the fruits (colour parameters, texture and total soluble solids content).

With these preliminary data, this methodology may constitute an interesting line to be continued to deep in about fungal infections predictions and mechanical impacts detections for the consequent shelf life fresh fruit optimization.

Key words: Citrus fruits, gas chromatography, respiration rates, *Penicillium* sp, mechanical impacts

Índice de Contenidos

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1. ORIGEN DE LOS CÍTRICOS	1
I.2. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE CÍTRICOS	3
I.3. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE LOS FRUTOS CÍTRICOS	15
I.3.1. La Respiración	17
I.3.2. Cociente Respiratorio	28
I.3.3. Compuestos volátiles	30
I.3.4. Tasa Respiratoria	38
I.3.5. Métodos de Medida de la Tasa Respiratoria	39
I.4. ALMACENAMIENTO POSTCOSECHA DE FRUTOS CÍTRICOS	45
I.5. PÉRDIDAS Y DAÑOS EN POSTCOSECHA	48
I.5.1. Enfermedades causadas por hongos en la postrecolección de cítricos	52
I.6. TÉCNICAS ACTUALES DE DETECCIÓN DE DAÑOS EN POSTCOSECHA	54
I.7. MODELOS BIOLÓGICOS	63
II. JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL TRABAJO	69
III. OBJETIVOS	71
IV. PLAN DE TRABAJO	73
V. RESPUESTA FISIOLÓGICA DE NARANJAS SOMETIDAS A UN ESTRÉS FÚNGICO	77
V.1. INTRODUCCIÓN	77
V.1.1. El proceso infeccioso de patógenos fúngicos en frutos cítricos	77
V.1.2. El género <i>Penicillium</i>	78
V.1.2.1. <i>Penicillium digitatum</i> Saccardo	79
V.1.2.2. <i>Penicillium italicum</i> Wehmer	81
V.2. MATERIALES Y MÉTODOS	83
V.2.1. Materia prima	83

Índice de contenidos

V.2.1.1. Fruta	83
V.2.1.2. Cultivo de las cepas de los mohos utilizados	83
V.2.2. Caracterización de la materia prima	85
V.2.2.1. Peso	85
V.2.2.2. Volumen y superficie	85
V.2.2.3. Resistencia mecánica o firmeza	86
V.2.2.4. Espesor de la corteza	86
V.2.2.5. Porcentaje de zumo	87
V.2.2.6. Sólidos solubles del zumo	87
V.2.2.7. Acidez en zumo	87
V.2.2.8. Índice de madurez	88
V.2.3. Inoculación de las frutas con esporas de <i>penicillium</i>	88
V.2.4. Análisis de la actividad respiratoria	90
V.2.4.1. Sistema de análisis	90
V.2.4.2. Metodología de análisis	93
V.2.5. Plan experimental	96
V.2.6. Cuantificación de la infección fúngica	100
V.2.7. Análisis estadístico	102
V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
V.3.1. Desarrollo de un sistema analítico para la medida de la respiración en frutas	103
V.3.1.1. Determinación de los tiempos óptimos de análisis	104
V.3.2. Flujos gaseosos en el sistema	108
V.3.3. Experimentos preliminares de análisis de la tasa respiratoria	113
V.3.4. Caracterización de la materia prima de las frutas a inocular	122
V.3.5. Cultivos de las cepas de los mohos utilizados	124
V.3.6. Comportamiento de las frutas inoculadas	128

V.3.6.1. Flujos respiratorios como consecuencia de la infección	129
V.3.6.2. Evolución de la superficie de infección	141
V.3.6.3. Relación entre tasas respiratorias y desarrollo en superficie	151
V.3.6.4. Desarrollo de otros componentes volátiles	153
V.3.6.5. Impacto del avance de la infección sobre los metabolismos energéticos celulares	157
V.4. CONCLUSIONES	165
VI. RESPUESTA FISIOLÓGICA DE MANZANAS SOMETIDAS A UN ESTRÉS MECÁNICO	169
VI.1. INTRODUCCIÓN	169
VI.1.1. Daños mecánicos en postcosecha	170
VI.1.1.1. Origen de los daños	170
VI.1.1.2. Consecuencias de los daños	173
VI.1.1.3. Métodos de evaluación de daños mecánicos en frutas y hortalizas	177
VI.2. MATERIALES Y MÉTODOS	181
VI.2.1. Materia prima	181
VI.2.2. Preparación de muestras	181
VI.2.3. Impactos	183
VI.2.4. Análisis no destructivos	184
VI.2.4.1. Evaluación de la tasa respiratoria	184
VI.2.4.2. Parámetros de color	184
VI.2.5. Análisis destructivos	186
VI.2.5.1. Propiedades mecánicas	186
VI.2.5.2. Contenido en sólidos solubles	188
VI.2.6. Estudio estadístico de los datos obtenidos	189
VI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	191
VI.3.1. Determinación de las fuerzas de impacto	191
VI.3.2. Evaluación de la tasa respiratoria	197
VI.3.3. Propiedades ópticas	202

Índice de contenidos

VI.3.4. Propiedades mecánicas	213
VI.3.5. Contenido de sólidos solubles	219
VI.4. CONCLUSIONES	221
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES	223
VIII. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	225

Índice de Figuras

Fig. I.1. Distribución de la producción mundial de cítricos (Media 1997/2001) (Fuente: Adaptado de Franco, 2002).	5
Fig. I.2. Destino de la producción mundial de cítricos total y por especie (Media 1999/2000-2001/2002) (Fuente: Adaptado de Franco, 2002).	6
Fig. I.3. Destino de la producción mundial de cítricos (Media 1999/2000-2001/2002) (Fuente: Adaptado de Franco, 2002).	7
Fig. 1.4. Valores en toneladas (t) x 10 ³ de producción y exportación de cítricos de España (Fuente: CLAM).	8
Fig. I.5. Distribución varietal de la producción cítrica (t) española (MAPA, 2001).	8
Fig. I.6. Producción de cítricos de los principales países del Hemisferio Sur en miles de toneladas en el año 2001 (Fuente: Codina, 2002).	12
Fig. I.7. Producción cítrica uruguaya por especie (Fuente: Comisión Honoraria Nacional del Plan Cítrico (CHNPC), 2001).	13
Fig. I.8. Destino de las exportaciones de cítricos uruguayos (Fuente: C. H. N. P. C., 2001).	14
Fig. I.9. Las reacciones de la glicólisis y de la fermentación (Taiz y Zeiger, 1998).	22
Fig. I.10. Ciclo de Krebs ó ciclo de los TCA (ácidos tricarbónicos) (Taiz y Zeiger, 1998).	24
Fig. I.11. Rutas metabólicas en vegetales (Taiz y Zeiger, 1998).	25
Fig. I.12. El gradiente electroquímico de los protones a través de la membrana interna de la mitocondria (Taiz y Zeiger, 1998).	27
Fig. I.13. Rutas energéticas celulares (Berkaloff et al., 1986)	30
Fig. V.1.1. <i>Penicillium digitatum</i> Saccardo. A) Dibujos de Penicilos. B) Dibujos de Conidios Maduros (Fuente: Ramírez, 1982).	80
Fig. V.1.2. <i>Penicillium italicum</i> Wehmer. A) Detalles de Penicilos dibujados. B) Detalles de Conidios Maduros dibujados (Fuente: Ramírez, 1982).	82

Fig. V.2.1. Cultivos de <i>Penicillium digitatum</i> y <i>Penicillium italicum</i> en tubo: (a) y en placas (b) logrados a partir de liófilos puros obtenidos de la CETC.	85
Fig. V.2.2. Medida del espesor de la corteza de las frutas.	87
Fig. V.2.3. Orificio de punción e inoculación en la corteza de naranja.	89
Fig. V.2.4. Cámaras de respiración o respirómetros. (a) Cristal, (b) Acero Inoxidable. Detalle de las tomas de muestras con sus conexiones directas al micro cromatógrafo de gases (mCG).	91
Fig. V.2.5. Detalle del mCG conectado (→) a la cámara de respiración ubicado dentro de la incubadora con control de temperatura (21 °C).	95
Fig. V.2.6. Respirómetro con disolución salina acidificada.	96
Fig. V.2.7. a) Detalle interno del desecador: Naranjas inoculadas almacenadas con control de HR y T. b) Detalle externo del desecador. Orificio de ventilación abierto (→).	97
Fig. V.2.8. Secuencia de pasos durante los ensayos.	99
Fig. V.2.9. Diagrama del cálculo de la superficie de revolución mediante la ecuación de la Integral de Riemann.	101
Fig. V.3.1. Esquema de la evolución del sistema.	108
Fig. V.3.2. Evolución de la fracción molar de oxígeno (x_{O_2}) (▲) y de anhídrido carbónico (x_{CO_2}) (●) en el espacio de cabeza de una naranja variedad Navelate a 21°C y 75,5% HR.	115
Fig. V.3.3 Evolución de la tasa respiratoria (TR_{CO_2}) de una naranja var. Navelate durante 8 días a 21°C y 75,5%HR.	117
Fig. V.3.4. Evolución de la tasa respiratoria media (TR_{CO_2}) (mmol CO_2 /kg h) de 10 naranjas Navelate de 2 lotes diferentes a 21°C y 75,5% HR.	118
Fig. V.3.5. Cultivos obtenidos a partir del liófilo puro reconstituido de la cepa (CECT 2954) de <i>P. digitatum</i> Saccardo en PDA. a) En placa. b) En tubo.	126
Fig. V.3.6. Cultivos obtenidos a partir del liófilo puro reconstituido de la cepa (CECT 2294) de <i>P. italicum</i> Wehmer en PDA. a) En placa. b) En tubo.	126

Fig. V.3.7. Hemocitómetro con esporas de <i>P. italicum</i> Wehmer (a) y <i>P. digitatum</i> Saccardo (b).	127
Fig. V.3.8. Esquema del sistema naranja-entorno dentro del respirómetro.	131
Fig. V.3.9. Evolución de las tasas respiratorias de naranjas Navelate inoculadas con: <i>P. digitatum</i> (■), <i>P. italicum</i> (□) y naranjas sin inocular (△). a) Lote 1 y b) Lote 2. (Flecha = momento de inoculación artificial).	132
Fig. V.3.10. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 1 inoculadas con <i>P. italicum</i> , almacenadas a 21°C y 75,5% HR.	139
Fig. V.3.11. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 1 inoculadas con <i>P. digitatum</i> , almacenadas a 21°C y 75,5% HR.	139
Fig. V.3.12. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 2 inoculadas con <i>P. italicum</i> , almacenadas a 21°C y 85% HR.	140
Fig. V.3.13. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 2 inoculadas con <i>P. digitatum</i> , almacenadas a 21°C y 85% HR.	140
Fig. V.3.14. Desarrollo de infección fúngica de naranjas Navelate (lote 1) inoculadas con esporas de <i>P. italicum</i> Wehmer, almacenadas a 21°C y 75,5% HR. a) y b) Vista ecuatorial de ambas naranjas previo a la inoculación. c) y d) Vista apical de ambas naranjas previo a la inoculación. e) 4° DPI. f) 7° DPI. g) 8° DPI.	142
Fig. V.3.15. Desarrollo de infección fúngica de naranjas Navelate (lote 1) inoculadas con esporas de <i>P. digitatum</i> Saccardo, almacenadas a 21°C y 75,5% HR. a) Previo a la inoculación. b) 2° DPI. c) 3 ^{er} DPI (con ampliación zona dañada). d) 4° DPI. e) 7° DPI. f) 8° DPI. g) 9° DPI; comparación con naranja sin inocular del mismo lote.	143
Fig. V.3.16. Desarrollo de infección fúngica de naranjas Navelate (lote 2) inoculadas con esporas de <i>P. italicum</i> Wehmer, almacenadas a 21°C y 85% HR. a) 2° DPI. b) 4° DPI. c) 7° DPI. d) 8° DPI.	145
Fig. V.3.17. Desarrollo de infección fúngica de naranjas Navelate (lote 2) inoculadas con esporas de <i>P. digitatum</i> Sacc. almacenadas a 21°C y 85% HR. a) 12 horas tras inoculación. b) 4° DPI. c) 7° DPI. d) 8° DPI con ampliación de zonas inoculadas.	146

Fig. V.3.18. Superficie de heridas (S_h) vs Tiempo de las naranjas inoculadas con esporas de <i>Penicillium sp.</i>	148
Fig. V.3.19. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 1 inoculadas con <i>P. italicum</i> almacenadas a 21°C y 75,5% HR.	149
Fig. V.3.20. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 1 inoculadas con <i>P. digitatum</i> almacenadas a 21°C y 75,5% HR.	150
Fig. V.3.21. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate lote 2 inoculadas con <i>P. italicum</i> almacenadas a 21°C y 85% HR.	150
Fig. V.3.22. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate lote 2 inoculadas con <i>P. digitatum</i> almacenadas a 21°C y 85% HR.	151
Fig. V.3.23. Tasa respiratoria media (TR_{CO_2}) y porcentaje medio de superficie de heridas (S_h) vs tiempo de almacenamiento a 21°C y 75,5% HR. Naranjas lote 1. Inoculadas con <i>P. digitatum</i> (■), con <i>P. italicum</i> Wehmer (■) y sin inocular (■).	152
Fig. V.3.24. Tasa respiratoria media (TR_{CO_2}) y porcentaje medio de superficie de heridas (S_h) vs tiempo de almacenamiento a 21°C y 85% HR. Naranjas lote 2. Inoculadas con <i>P. digitatum</i> (■), con <i>P. italicum</i> Wehmer (■) y sin inocular (■).	152
Fig. V.3.25. Evolución de la variación de acetaldehído (■) y etanol (■) en el espacio de cabeza de naranjas var. Navelate (lote 1) inoculadas con <i>P. digitatum</i> vs tiempo de almacenamiento.	154
Fig. V.3.26. Evolución de la variación de acetaldehído (■) y etanol (■) en el espacio de cabeza de naranjas var. Navelate (lote 2) inoculadas con <i>P. digitatum</i> y etanol (●) en frutas inoculadas con <i>P. italicum</i> vs tiempo de almacenamiento.	156
Fig. V.3.27. Esquema de cálculo de la variación de moles de etanol y acetaldehído.	161
Fig. V.3.28. Incremento relativo de la tasa respiratoria vs superficie de heridas de infección en naranjas var Navelate inoculadas con esporas de <i>P. digitatum</i> (■) y <i>P. italicum</i> (□), almacenadas a 21°C y 75,5% HR, del lote 1.	162

Fig. V.3.29. Incremento relativo de la tasa respiratoria vs superficie de heridas de infección en naranjas var Navelate inoculadas con esporas de <i>P. digitatum</i> (■) y <i>P. italicum</i> (□), almacenadas a 21°C y 85% HR, del lote 2.	163
Fig. VI.2.1. Secuencia de pasos realizada durante los ensayos.	182
Fig. VI.2.2. Realización de los impactos en manzanas Granny Smith con el péndulo diseñado por Aunión (2002).	184
Fig. VI.2.3. Texturómetro Stable Micro System modelo "TA TX" versión 3.7 H.	187
Fig. VI.2.4. Detalle de uno de los ensayos de punción realizado.	188
Fig. VI.3.1. Variables a considerar en el péndulo.	193
Fig. VI.3.2. Relación entre fuerzas de impacto (N) y alturas equivalentes de caída (mm).	196
Fig. VI.3.3. Evolución de la fracción molar del anhídrido carbónico (x_{CO_2}) de una manzana con el tiempo del ensayo (minutos).	198
Fig. VI.3.4. Variación de la tasa respiratoria TR_{CO_2} (mmolCO ₂ /kg h) con la intensidad del impacto mecánico y el tiempo de almacenamiento.	199
Fig. VI.3.5. Evolución del tono (h^*/h^*_0) en la zona afectada respecto del tiempo de almacenamiento (días).	203
Fig. VI.3.6. Evolución del croma (c^*/c^*_0) en la zona impactada en función del tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.	205
Fig. VI.3.7. Evolución de los cambios de color (ΔE^*) con el tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.	207
Fig. VI.3.8. Evolución de la Luminosidad (L^*/L^*_0) con el tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.	209
Fig. VI.3.9. Evolución de a^*/a^*_0 con el tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.	210
Fig. VI.3.10. Evolución de b^*/b^*_0 con el tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.	212
Fig. VI.3.11. Fuerza máxima de penetración según la fuerza media de impacto de Timoshenko recibida.	214

Fig. VI.3.12. Valores medios y sus desviaciones de distancia máxima por grupo de fuerza media de impacto recibida por las manzanas.	216
Fig. VI.3.13. Pendiente en el tramo lineal (E_L) (N/mm) en función de los grupos de fuerza media de impacto recibida.	217
Fig. VI.3.14. Dureza de las muestras en función de la fuerza de impacto aplicada.	217
Fig. VI.3.15. Punto de ruptura/corte de la textura en función de los grupos de fuerza de impacto.	218
Fig. VI.3.16. Variación en el tiempo (días) del cociente °Brix zona dañada /°Brix zona sana según los grupos de fuerza media de impacto de Timoshenko recibida.	219

Índice de Tablas

Tabla I.1. Previsión de la producción cítrica en la Campaña 2004/2005 según datos de la Consellería de Agricultura de la Comunidad Valenciana (<i>Camp Valencià</i> , 2004).	11
Tabla I.2. Valores de exportaciones (kg) de cítricos de Uruguay durante el año 2004 (Silva, 2004).	14
Tabla I.3. Componentes volátiles (ppm) del aroma y sabor del zumo cítrico fresco (Fuente: Adaptado de Nísperos-Carriedo y Shaw, 1990).	32
Tabla I.4. Valores de tasas respiratorias óptimas en naranjas almacenadas (Arpaia y Kader, 2000).	47
Tabla V.2.1. Condiciones de trabajo del micro cromatógrafo de gases (mCG) para ambos métodos.	94
Tabla V.3.1. Tiempos (horas) estimados para las renovaciones de aire.	106
Tabla V.3.2. Error del análisis en porcentaje (ε) en ensayos con una sola naranja a 5°C.	107
Tabla V.3.3. Tasas respiratorias (mol/ kgh y mL/ kgh) y CR para la naranja Navelate analizada.	115
Tabla V.3.4. Características de la materia prima utilizada en los ensayos de la medida de la respiración.	119
Tabla V.3.5. Características de la materia prima utilizada en los ensayos de respiración e inoculación.	123
Tabla V.3.6. Resumen de las características observadas visualmente de los mohos cultivados en los medios Patata Dextrosa Agar pobre (PDA _p); Maltosa Agar pobre (MA _p); Maltosa Agar (MA); Patata Dextrosa Agar (PDA); Agua de Peptona y distintas modalidades.	125
Tabla V.3.7. Parámetros del modelo de Gompertz obtenidos para los 4 tratamientos de inoculación.	138
Tabla V.3.8. Parámetros de Gompertz obtenidos para los 4 tratamientos.	149
Tabla VI.1.1. Susceptibilidad de las frutas a diversos tipos de lesiones mecánicas: susceptible (S); resistente (R); intermedio (I). (Fuente: Wills <i>et al.</i> , 1984).	170

Tabla VI.1.2. Pérdidas de postcosecha de frutas y hortalizas muestreadas en el área de comercio y venta de la zona de mercadeo de New York. (Fuente: Kays, 1991).	172
Tabla VI.3.1. Fuerzas medias (N) percibidas por las manzanas agrupadas en un mismo ángulo.	194
Tabla VI.3.2. Nomenclatura de los grupos de manzanas con sus correspondientes intervalos de fuerzas de impacto (N) para cada grupo y la fuerza de impacto media (N) aplicada a las frutas de cada grupo.	195
Tabla VI.3.3. Valores medios y sus desviaciones estándar de fuerzas de impacto aplicadas (F_{impacto}) y de los parámetros mecánicos obtenidos. F_{max} : fuerza máxima; d_{max} : distancia máxima; punto de ruptura ($F_{\text{max}}/d_{\text{max}}$); E_L (N/mm); Dureza (N/mm).	214

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Dado que el objetivo general de esta Tesis Doctoral se basa en el desarrollo de métodos analíticos de detección de estrés en fruta fresca, se expondrán en el presente capítulo de Introducción General los principales aspectos de los frutos cítricos, por haber constituido la materia prima con la cual se llevaron a cabo los ensayos pertinentes al desarrollo del método analítico, dada su disponibilidad local y temporal. Además, por su enorme importancia económica regional e internacional, se deriva la relevancia que tiene el desarrollo de métodos rápidos y positivos de detección de estrés, para este tipo de fruta en la postcosecha.

I.1. ORIGEN DE LOS CÍTRICOS

El término "agrios" es un nombre colectivo plural que designa los frutos y por extensión, los árboles que los producen, pertenecientes al género *Citrus*. Los principales agrios cultivados para la producción de frutos son: naranjos, mandarinos, clementinos, limoneros y pomelos. Otras especies de menor importancia son también objeto de cultivo en determinadas regiones: tal es el caso del cidro, cultivado en Córcega y en Italia; del naranjo amargo, cultivado en las riberas del río Guadalquivir en España, para la producción de naranjas amargas destinadas a la fabricación de mermeladas y los bergamotos, en algunas regiones de Francia, cultivados por sus esencias, que son utilizadas en la elaboración de perfumes (Loussert, 1992).

Las frutas cítricas se han cultivado y disfrutado durante más de 4.000 años. Su origen está en el sureste de Asia, incluyendo desde Arabia oriental hacia el este hasta Filipinas y desde el Himalaya hacia el sur hasta Indonesia o Australia. La zona sur-central de China podría ser importante como zona de origen de los cítricos por la diversidad de especies encontradas (Gmitter y Hu, 1990).

Los cítricos se mencionan en la Biblia. Se ordena en tiempos de “Sucot” o Festividad de las Cabañas “*ulekajtem lajem baiom harishon, peri ets hadar...*” (en idioma Hebreo), donde ya está el nombre de este fruto singular *hadar* en alusión al *Etrog* (*Citrus medica* L.), que al decir de los sabios, si bien *hadar* habla de belleza singular, hacen un juego de palabras y dicen, refiriendo al fruto, siendo la cita exacta del *Etrog*: “*hadar beetso col hashana*”, “el que vive en su árbol de año en año...” (*Midrash Vaikrá Raba, Perasha 30*), es decir, “que soporta el calor en el tórrido verano y el gélido frío del crudo invierno, habitando en su árbol todo el año” (Maarabi, 2004).

Según Maarabi (2004), enseñaban los sabios al hablar de los sueños que “aquella persona que sueña con un *Etrog*, es considerado un ser esbelto y digno delante de Su Hacedor “*Ha-roé etrog ba-jalom, hadur hú lifné Konó...*” (*Talmud* de Babilonia, Tratado de *Berajot 57A*).

La religión judía usaba los cítricos en sus ceremonias durante los años 50 – 150 e. c., (Webber *et al.*, 1967).

El primer fruto cítrico conocido por los occidentales fue la toronja o cidro (*Citrus medica* L.). Es originario de la región comprendida entre el sur de China y la India y se encontró cultivado en Media (hoy Irán) por los científicos que acompañaban a Alejandro Magno en sus conquistas asiáticas (aproximadamente en el año 330 a. c.). Más tarde la toronja fue llevada a la costa mediterránea: a Sicilia por el Norte y a la zona del Medio Oriente por el Sur. Hay especialistas que opinan que los judíos tuvieron conocimiento de la toronja con ocasión de su cautiverio en Babilonia (586- 539 a.c.) dado que ya se cultivaba este fruto en Mesopotamia antes de este período. Fueron los árabes quienes difundieron los agrios en España propagándolos en parques, jardines y calles (Sevilla, Granada, Córdoba, Baleares, Levante y Andalucía). Sus flores eran empleadas con frecuencia en ceremonias religiosas (Amorós, 1989).

La cita más antigua que se conoce procede de China y pertenece al Libro de la Historia (Siglo V. a. c.). En este se explica cómo el emperador Ta-Yu (Siglo XXIII a. c.) incluyó entre sus impuestos la entrega de 2 tipos de naranjas, grandes y pequeñas (Agustí, 2000).

Otros cítricos se introdujeron en Italia durante los comienzos del Imperio Romano (27 a. c. – 284 e.c.) pero se cree que fueron destruidos al final del mismo (Davies y Albrigo, 1994).

Su cultivo se confunde con la historia de las antiguas civilizaciones de la China, que los cultivaron primero por sus perfumes y más tarde por sus frutos. La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen se debió fundamentalmente a los grandes movimientos migratorios: conquistas asiáticas de Alejandro Magno (Amorós, 1999), expansión del Islam, cruzadas, descubrimiento de América, etc. (Loussert, 1992).

I.2. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE CÍTRICOS

En la actualidad los cítricos se cultivan en los 5 continentes, en una zona amplia comprendida entre los paralelos 40°N y 40°S, dividida a su vez en dos subzonas: la zona tropical, que comprende desde los paralelos 15°S a 15°N, y la zona subtropical, dividida en dos franjas, una desde los 15°S a los 40°S y la otra de los 15°N a los 40°N (Spiegel-Roy y Goldschmit, 1996).

En el año 2001, la producción mundial de frutas alcanzó los 466,4 millones de toneladas, con un crecimiento continuo, que en los últimos años llegó al 10%. La producción mundial de frutas está liderada por los cítricos, con valores superiores a los 95.000.000 de toneladas, distribuidas entre las diferentes variedades de naranjas (61,9%), mandarinas (16,8%), limones y limas (11,0%), pomelos (4,9%) y otros (5,4%) (FAO, 2002).

Los principales países productores de cítricos en el Mediterráneo norte son: España, Italia, Grecia y Turquía; en el Mediterráneo sur: Marruecos, Egipto,

Israel, Túnez, Líbano y Argelia; en Norteamérica: USA, México y Bélize; en Sudamérica: Brasil, Venezuela, Argentina y Uruguay; en el Caribe: Cuba, Jamaica y República Dominicana. Otros países importantes en la producción de cítricos son: China, Japón, Sudáfrica y Australia (Davies y Albrigo, 1994).

Desde comienzos de la década de los años ochenta, Sudamérica es la primera región productora de cítricos, siendo Brasil en la actualidad el mayor productor a escala mundial, con una estructura orientada principalmente a la producción de naranjas para industrializar.

En las últimas décadas la producción mundial de cítricos ha experimentado un aumento considerable (Franco, 2002), impulsado por el desarrollo de los medios de transporte y las nuevas tecnologías, así como la progresiva liberalización y reducción de barreras comerciales.

Este crecimiento se ha experimentado por lo general en todas las especies cítricas, si bien a escala mundial ha sido más acusado en las mandarinas. Las naranjas continúan siendo la principal especie cítrica cultivada en el ámbito mundial y su producción supera desde la segunda mitad de los años noventa los 60 millones de toneladas. La distribución de la producción mundial de cítricos se detalla en la Fig. I.1., en la que se expresan los valores de la distribución de la producción mundial como media de los años 1997 al 2001.

Junto a la capacidad productiva de los distintos países resulta especialmente revelador analizar el destino que se le da a la producción en cada uno de ellos. Así, es posible distinguir tres grandes orientaciones a las que se dirigen los productos cítricos: el consumo en fresco en el propio país de origen; la exportación de la producción en fresco a terceros países o su destino a la industria de transformación, para su posterior comercialización como producto procesado (Franco, 2002).

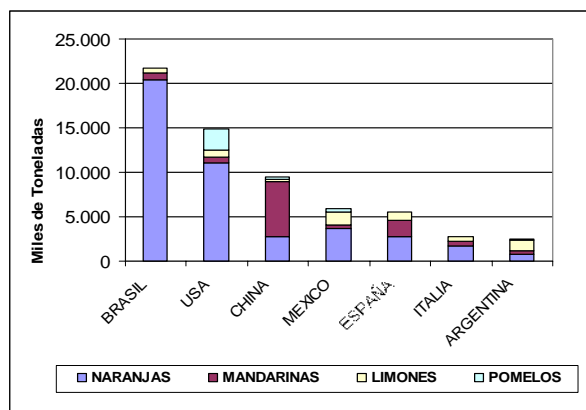


Fig. I.1. Distribución de la producción mundial de cítricos (Media 1997/2001)
(Fuente: Adaptado de Franco, 2002).

Como se aprecia en la Fig. I.2., la mayor parte de la producción mundial de cítricos se orienta en proporción similar al consumo en fresco en los propios países de origen (47%) y a transformación (42%), mientras que el volumen exportado en fresco constituye el 11% del total, aunque algunos de estos datos enmascaran diferencias en el destino de las distintas especies. Así, la producción de naranjas se dirige en su mayor parte a las transformación (51%) y tan solo se exporta un reducido porcentaje en fresco (8%). Por el contrario, las mandarinas tienen una vocación principal hacia el consumo en fresco, dado que tres cuartas partes se consumen en los países de origen y un 14% se exportan en fresco (Franco, 2002).

El reparto de los limones y pomelos se muestra más equilibrado entre las tres orientaciones, destinándose un 45% por ciento a transformación, un 33% a consumo en fresco y un 22% a exportaciones (Franco, 2002).

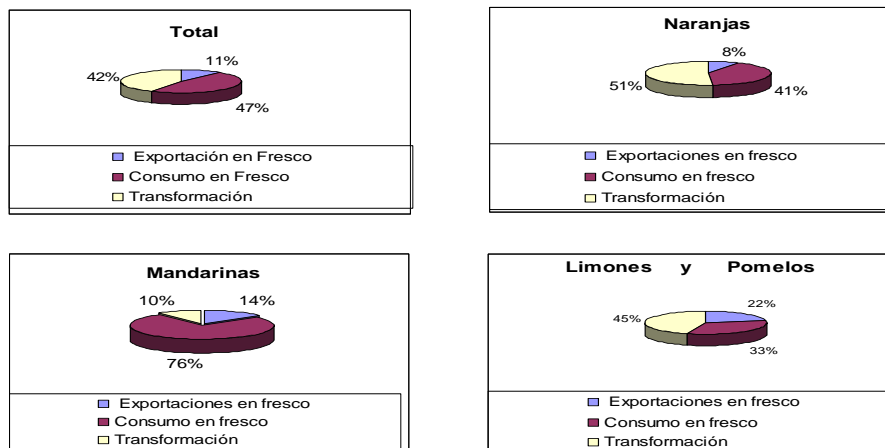


Fig. I.2. Destino de la producción mundial de cítricos total y por especie (Media 1999/2000-2001/2002) (Fuente: Adaptado de Franco, 2002).

Esta distribución está relacionada con la especialización productiva de los principales países cítricos. En la Fig. I.3. se observa como Brasil y USA, las dos primeras potencias cítricas, dedican más de las dos terceras partes de su producción, mayoritariamente de naranjas, a la transformación. A su vez, las dos siguientes zonas productoras, China y Méjico, orientan su producción al consumo interior en fresco que supone estar en torno al 90%. En cambio, en España, predomina la exportación en fresco que significa más de la mitad de su producción, lo que hace que España sea la primera potencia mundial exportadora de productos en fresco, especialidad en la que se acapara un gran segmento del mercado internacional, con una cuota cercana al 40%. Las otras zonas relevantes en este aspecto son USA y el resto de países productores de la cuenca del Mediterráneo, donde se exportan más de 1.000 y 2.000 toneladas respectivamente (Franco, 2002).

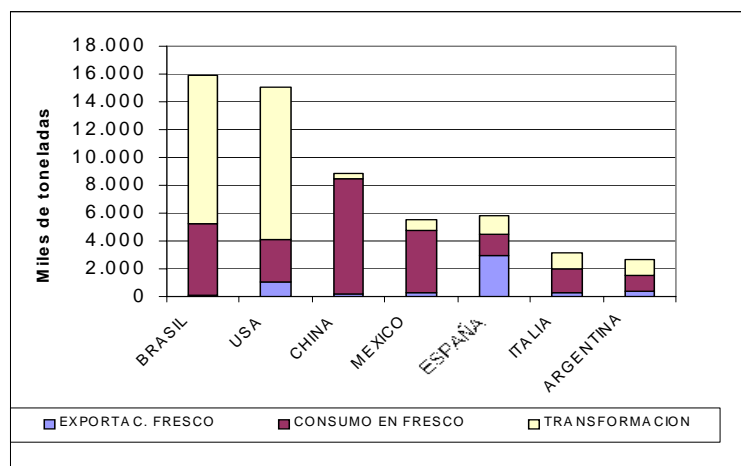


Fig. I.3. Destino de la producción mundial de cítricos (Media 1999/2000-2001/2002)
(Fuente: Adaptado de Franco, 2002).

En España, la producción se distribuye entre Cataluña: 3%; C. Valenciana: 66%; Murcia: 14% y Andalucía: 17% (Zaragoza y Agustí, 2001).

Dentro de la producción española, hay que destacar el peso importante que tienen los cítricos valencianos, destacando la producción de naranjas y sobre todo la de mandarinas. En el aforo de la campaña 2002/2003 se previó una producción en la Comunidad Valenciana de 3.610.989 toneladas, de las cuales 1.653.196 corresponden a mandarinas, 1.645.666 a naranja dulce, 306.287 a limones y 5.840 a pomelos (Franco, 2002).

Respecto a los valores de producción y de exportación de la campaña 2000-2001 en España, según el CLAM (*Comité de Liaison de l'Agrumiculture Méditerranéenne*) los mismos se detallan en la Fig. I.4.

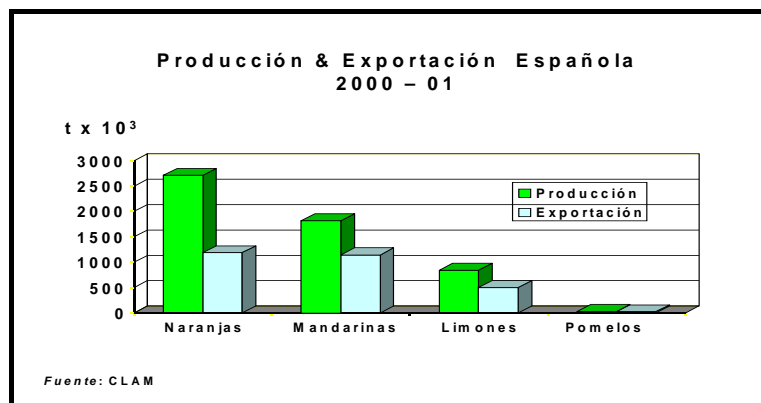


Fig. 1.4. Valores en toneladas (t) x 10³ de producción y exportación de cítricos de España (Fuente: CLAM).

Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), año 2001, la distribución varietal de la producción cítrica en España es la que se detalla en la Fig. I.5. Se observa que el volumen mayor de producción lo constituyeron dicho año las naranjas de la variedad *Navel*, en 2º lugar las mandarinas, variedad *Clementinas*; en 3º lugar las naranjas, variedad *Blancas*; en 4º lugar los Híbridos y en 5º lugar otras variedades.

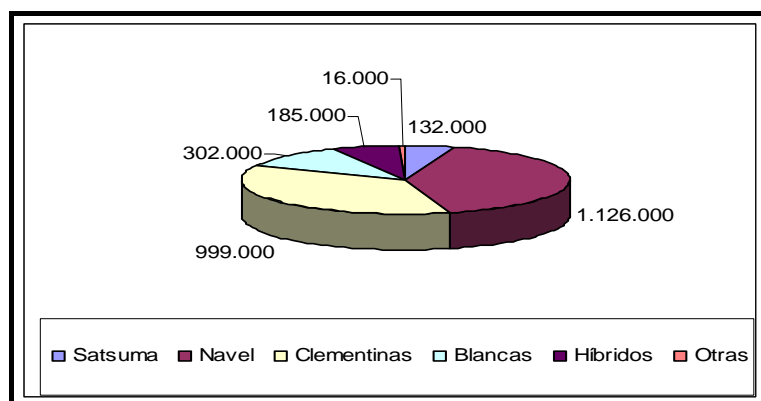


Fig. I.5. Distribución varietal de la producción cítrica (t) española (MAPA, 2001).

El destino mayoritario de la exportación cítrica española (28%) fue Alemania, luego le siguen en orden de importancia la categoría "otros" países (21,2%) los cuales incluyen Polonia (que se ha constituido en un centro re-exportador de cítricos a los países de la ex URSS (Franco, 2002), USA., otros países de Europa, otros terceros países; a continuación Francia con un 17% y con un 11% el Reino Unido (MAPA, 2001).

Según datos del CLAM, para las campañas de los años 2000-2001, el 53% de la producción estuvo destinado a la exportación, el 25% al consumo interno, el 13% a la industria del procesado de los cítricos (zumos, néctares, mermeladas, etc.) y el 9% representa las pérdidas de la producción donde están incluidos los descartes de fruta que no se usan ni para consumo en fresco ni para procesados.

Según datos de Intercitrus (Junio 2003), por la ampliación de la Unión Europea el consumo de cítricos seguramente seguirá aumentando y por lo tanto las exportaciones de España hacia esos países (Polonia, Hungría, Letonia, Lituania, Malta, Eslovaquia, Eslovenia, Estonia, República Checa y Chipre). Además, el número de cítricos exportados de esa campaña constituyó una cifra record: 3.000.000 de toneladas. Asimismo, según la misma fuente, se ha vuelto a exportar con normalidad hacia USA lo que ha constituido otra plaza de colocación de los productos cítricos (fundamentalmente clementinas) con un protocolo normalizado, constituyéndose en un mercado de referencia. Actualmente el aporte de España representa un 7 - 8% del mercado interno de dicho país.

Según datos publicados en Agrícola Vergel (2003) sobre información proveniente de la Consellería de Agricultura, la previsión de la producción de cítricos de la Comunidad Valenciana para la campaña 2003/2004 es de 3.766.620 toneladas, siendo la primera cosecha en volumen de producción de los cinco últimos años, significando un incremento del 15% sobre el balance de la campaña anterior, que alcanzó las 3.274.861 toneladas, confirmándose una

recuperación de la producción de la cosecha tras el descenso sufrido en la campaña 2001/2002.

En esta misma fuente se plantea que el incremento previsto para la cosecha de cítricos se basa en el aumento experimentado por otras frutas cítricas, los limones y naranjas. En limones, con 347.171 toneladas, lo que implica un aumento de su producción de un 9,98% y así como el incremento de la producción de las naranjas en un 3,6% respecto al balance de la campaña anterior, con una producción prevista de 1.742.783 toneladas, con lo que se recuperan los niveles de campañas precedentes (Agrícola Vergel, 2003).

Específicamente, dentro de las naranjas, las del grupo "Navel", que constituye el grueso de la producción de cítricos de la Comunidad Valenciana con 1.229.400 toneladas, destaca el notable incremento de la cosecha prevista de "Navelate" y "Lanelate" que aumenta un 9,99% alcanzando las 228.970 toneladas, así como el mantenimiento de las Navelinas en unas 872.969 toneladas y el incremento de las naranjas tardías, variedad "Valencia Late" en un 23,03% más de producción (402.607 toneladas) (Agrícola Vergel, 2003).

En lo que ha transcurrido de la campaña de exportación citrícola 2003/2004 y con fecha del 6 de mayo del 2004, se exportaron a países terceros un total de 656.178 toneladas entre todas las variedades de cítricos, según datos del Centro de Asistencia Técnica e Inspección de Comercio Exterior - SOIVRE-Valencia. En la campaña anterior, la 2002 – 2003, y en una fecha similar, el 8 de mayo del 2003, lo exportado eran, según la misma fuente, unas 672.272 toneladas. Los principales importadores (en Toneladas) han sido Polonia (187.286); Rep. Checa (76.959); USA (69.997); Rusia (67.326); Suiza (58.185); Hungría (39.292) y Noruega (37.591). Las variedades que más se han exportado (por Tonelada) han sido: Clementina (203.330); Limón (184.004); Navelina (110.450); Navelate (21.219); Ortanique (20.476); Lane Late (20.153) y Valencia late (14.305) (Valencia Fruits, 2004, a).

Respecto a la importación citrícola de países terceros, en la campaña 2003/2004 al 6 de mayo del 2004, se llevaban importadas casi 2 toneladas, según el Centro de Inspección de Comercio Exterior – SOIVRE – Valencia, provenientes de: Marruecos (1.905.065 kg), Ecuador (21.879 kg), Colombia (16.200 kg) e Israel (320 kg), constituyendo las naranjas las variedades principales (1.277.178 kg) (Valencia Fruits, 2004, b).

La previsión de la producción de cítricos para la campaña 2004/2005 según datos de la Consellería de Agricultura de la Comunidad Valenciana se detallan en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Previsión de la producción citrícola en la Campaña 2004/2005 según datos de la Consellería de Agricultura de la Comunidad Valenciana (Camp Valencià, 2004).

ESPECIES	BALANCE (Toneladas) 2003/2004	PREVISIÓN (Toneladas) 2004/2005	VARIACIÓN
Mandarinas	1.714.254	1.977.072	15,33%
Naranjas	1.771.243	1.572.133	-11,24%
Limas	347.701	294.699	-15,24%
Pomelos	5.295	4.172	-21,21%
Total Cítricos	3.838.493	3.848.076	0,25%

Se anuncia un aumento del 0,25% en la campaña 2004/2005 respecto de la campaña 2003/2004, situándose en una producción de 3.848.076 toneladas de frutos cítricos en total.

Considerando que los resultados de esta Tesis Doctoral puedan ser extrapolables a otras realidades geográficas y siendo el Uruguay un país que en muchas de las campañas citrícolas ha suministrado y continúa suministrando este tipo de producto a España en contraestación, sería de interés describir algunas características de la citricultura en dicho país

sudamericano y con relación a su contexto mundial siendo uno de los 6 exportadores más relevantes de cítricos del Hemisferio Sur.

Los principales países exportadores de *Citrus* del Hemisferio Sur son Brasil, Argentina, Chile, Uruguay, Sur África y Australia, cuyos valores de producción cítrica se detallan en la Fig. I.6. (Codina, 2002). En la Fig. I.8. es posible observar el detalle de las exportaciones de fruta fresca en miles de toneladas y también ese valor convertido a porcentaje exportado sobre el total de lo producido de los 6 principales exportadores de *Citrus* del Hemisferio Sur (Codina, 2002).

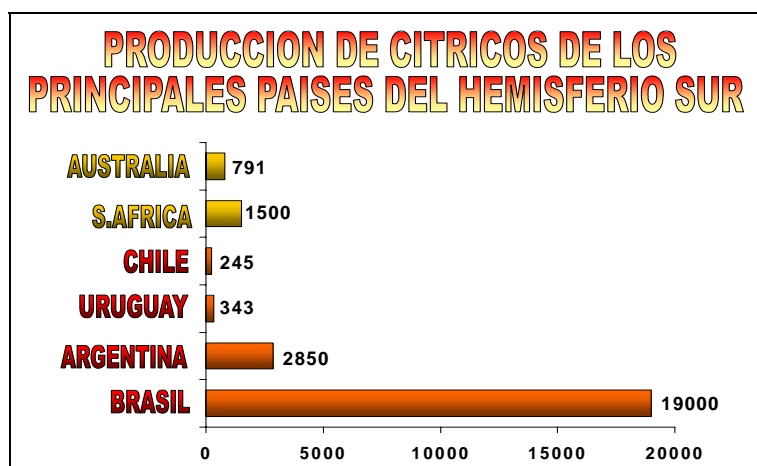


Fig. I.6. Producción de cítricos de los principales países del Hemisferio Sur en miles de toneladas en el año 2001 (Fuente: Codina, 2002).

Dentro de Sudamérica, Uruguay tiene un papel importante en la producción de cítricos, después de Brasil y Argentina (Davies y Albrigo, 1994). Desde hace más de 40 años los productores uruguayos se encuentran produciendo cítricos con el único objetivo de exportar fruta en fresco; ya que la industria y el mercado interno, no tienen mayor relevancia (Codina, 2002).

La producción total en la campaña 2000-2001, según la Comisión Honoraria Nacional del Plan Cítrico (CHNPC) del Uruguay, fue de 343.000

toneladas (Fig. I.7.) de las cuales el 35% se exportaron como fruta fresca. Del total exportado, 14% fueron limones, 28% mandarinas, 55% naranjas, mientras que los pomelos alcanzaron el 3% del total exportado (Codina, 2002)

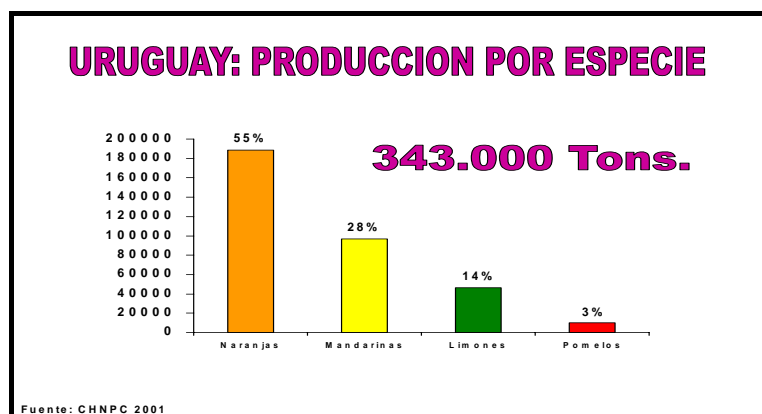


Fig. I.7. Producción citrícola uruguaya por especie (Fuente: Comisión Honoraria Nacional del Plan Citrícola (CHNPC), 2001).

Las exportaciones de ultramar empiezan a comienzos del mes de Marzo y finalizan generalmente durante la segunda quincena de Noviembre. Tienen como destino más de 30 países, siendo la Unión Europea el principal cliente de Uruguay con un volumen cercano al 80% de las exportaciones. De los países comunitarios en la campaña 2001, España fue el principal comprador (32%) (Fig. I.8.).

Las variedades uruguayas que generalmente se ofertan son: de naranjas, la principal es la Valencia Late, seguidas por las Navel y la Salustiana; en mandarinas la oferta se centra en Satsumas, Clemenules, Clemenvilla, Clemendor (una mandarina común sin semilla), Ellendales, Minneolas, Avana, Salteñita, Ortanique y Murcott entre otras.

En limones, hay diferentes variedades, mientras que en pomelos las variedades son el Marsh Seedles (blanco), el Star Ruby (rojo) y el Ruby Red (rosado).

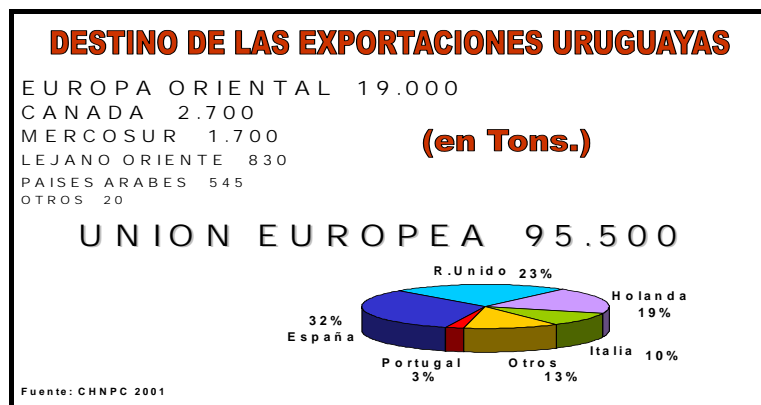


Fig. I.8. Destino de las exportaciones de cítricos uruguayos (Fuente: C. H. N. P. C., 2001).

Las exportaciones de frutos cítricos de Uruguay en general y específicamente de frutos cítricos a España durante el año 2004 fueron las que se detallan en la Tabla I.2. según datos proporcionados por el Frigorífico Modelo en Montevideo, Uruguay (Silva, 2004).

Tabla I.2. Valores de exportaciones (kg) de cítricos de Uruguay durante el año 2004 (Silva, 2004).

	Exportac. de Uruguay (kg)	Exportac. de Uruguay a España (kg)	%
Limón	13.251.846	2.076.611	16
Mandarinas	37.613.714	1.418.002	4
Naranjas	67.045.054	25.393.643	38
Pomelos	1.402.513	-----	----
TOTAL	119.312.127	28.888.256	24,2

Por los datos anteriormente expuestos de volúmenes de producción y exportación detallados, es posible deducir que la producción de frutas cítricas en el ámbito mundial y en particular en España y Uruguay es de gran importancia.

Se refleja en los mismos la enorme popularidad de los frutos cítricos la cual podría deberse a diferentes razones:

a) Dietético-saludables, puesto que el consumo de dichas frutas (en especial en fresco) implica un aporte importante de vitamina C, sustancia hidrosoluble con una gran capacidad antioxidante, que el ser humano es incapaz de sintetizar por sí mismo y que es fundamental en la regulación de ciertas funciones vitales; por el aporte de otros nutrientes (otras vitaminas y bioflavonoides); por la percepción que se tiene de que los cítricos son buenos para prevenir la gripe y el constipado y por su fama histórica de que la vitamina C es buena contra la enfermedad del escorbuto.

b) Económicas, pues consisten en una fuente de materia prima a la industria del procesado de cítricos (zumos, néctares, mermeladas); a la fabricación de piensos (cortezas) y para la industria cosmética y de perfumes con los aceites esenciales.

I.3. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE LOS FRUTOS CÍTRICOS

El crecimiento y la maduración fisiológica de la fruta sólo se completan cuando permanece unida a la planta de procedencia, pero la maduración organoléptica y la senescencia pueden proseguir una vez separada de aquella. Las frutas sufren tras su recolección numerosos cambios físico-químicos determinantes de su calidad al ser adquiridos por el consumidor (Wills *et al.*, 1984).

La maduración organoléptica de frutas y hortalizas, es decir, la transformación de un tejido fisiológicamente maduro pero no comestible en otro visual, olfatorio y gustativamente atractivo, requiere de la síntesis de: nuevas proteínas, ARNm, pigmentos y compuestos aromáticos. Estos procesos anabólicos demandan energía y aporte de esqueletos carbonados, que son suministrados por la respiración (Tucker, 1993).

Las frutas y hortalizas respiran tomando oxígeno (O_2) y desprendiendo dióxido de carbono (CO_2) y calor. También transpiran, es decir pierden agua (Wills *et al.*, 1984).

De acuerdo con su comportamiento respiratorio durante la maduración organoléptica, los frutos se clasifican en climatéricos y no climatéricos (Biale, 1960). Los frutos climatéricos como las manzanas, peras, tomates y bananas entre otros, muestran un pico respiratorio durante la maduración organoléptica que puede estar dado por un incremento en la producción de CO_2 o por la disminución de la concentración interna de O_2 y por el aumento de la producción de etileno. Los frutos no climatéricos (cítricos, piña, uvas entre otros) manifiestan la mayor parte de las transformaciones características de la maduración organoléptica aunque a un ritmo más lento y sin presentar un pico respiratorio.

Si bien todas las frutas producen pequeñas cantidades de etileno a lo largo de su desarrollo, durante la maduración organoléptica los frutos climatéricos lo producen en cantidades mucho más elevadas (25-2.500 $\mu L/L$ en manzanas) que los no climatéricos (0,13-0,32 $\mu L/L$ en naranjas) (Wills *et al.*, 1984).

Los cítricos al ser frutos no climatéricos, en los que no se producen grandes cambios fisiológicos durante el almacenamiento, deben ser cosechados en su estado óptimo de maduración. Por lo tanto solo se alcanza en árbol el grado de madurez apropiado sin que se registren cambios dramáticos en la intensidad respiratoria ni en la producción de etileno (Cuquerella, 1999).

La producción de CO_2 y de etileno alcanzan en los frutos recolectados valores de 5-10 $mgCO_2 /kg h$ (a $5^\circ C$) y 0-0,1 $\mu L Etileno/kg h$ (a $20^\circ C$) respectivamente, lo que se corresponde con frutos no muy perecederos (Cuquerella, 1999).

Dado que la medida de la respiración de los frutos cítricos es un tema importante en esta Tesis Doctoral, se detallará a continuación el concepto de respiración en frutas y los métodos utilizados para su medida.

I.3.1. La Respiración

La respiración es un proceso metabólico fundamental tanto en el vegetal vivo como en el producto recolectado (Wills *et al.*, 1984).

Todos los seres vivos precisan de un suministro continuo de energía que permite llevar a cabo las reacciones metabólicas precisas para el mantenimiento de la organización celular, el transporte de metabolitos y el mantenimiento de la permeabilidad de la membrana.

La respiración básicamente es una operación inversa a la de la fotosíntesis por la que la energía luminosa procedente del sol se almacena en forma de energía química, principalmente en carbohidratos constituidos por unidades de glucosa. La respiración se puede describir como la degradación oxidativa de los productos más complejos normalmente presentes en las células, como el almidón, los azúcares y los ácidos orgánicos, a moléculas más simples, como el dióxido de carbono y el agua con la consiguiente liberación de energía metabólica y otras moléculas que pueden ser utilizadas para las reacciones sintéticas celulares. La respiración puede tener lugar en presencia de oxígeno (respiración aeróbica) o en su ausencia (respiración anaeróbica, a veces denominada fermentación) (Wills *et al.*, 1984).

Un adecuado manejo de las frutas y hortalizas tras su recolección precisa tener en consideración que se trata de estructuras vivas, puesto que continúan estando vivas y siguen desarrollando los procesos metabólicos y manteniendo los sistemas fisiológicos que operaban mientras se hallaban unidos al vegetal de procedencia (Wills *et al.*, 1984).

Mientras permanecen unidas a las plantas de origen, las pérdidas ocasionadas por la respiración y la transpiración se compensan mediante el

flujo de la savia que contiene agua, productos fotosintetizados (especialmente sacarosa y aminoácidos) y minerales. Tras la recolección, continúan respirando y transpirando dependiendo exclusivamente de sus reservas alimenticias y de su propio contenido en agua. Por tanto, las pérdidas de sustratos respirables no se compensan y se inicia el deterioro.

La respiración y por tanto, la vida útil de los frutos en general y de los cítricos como caso particular, depende de numerosos factores, tanto biológicos: procesos naturales de respiración, producción de etileno y transpiración; como ambientales, principalmente, la temperatura, la humedad y las concentraciones de gases en el ambiente, así como mecánicos: golpes y daños que se producen durante el proceso de recolección, almacenamiento y transporte (Wills *et al.*, 1984).

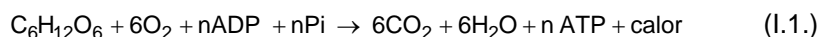
Luego de su recolección, los frutos presentan una serie de problemas derivados de la falta de aporte hídrico y de nutrientes desde la planta. Quedan entonces a expensas de su propio metabolismo y esto da lugar a una pérdida gradual de calidad de la fruta en sus características organolépticas de textura, sabor y aroma a medida que avanza su estado de senescencia y determina finalmente su muerte fisiológica (Cuquerella, 1990).

Este tipo de metabolismo limitado a sus propias reservas coloca además al fruto en una situación de debilidad frente a la deshidratación y las agresiones físicas externas tales como: fricción, golpes o heridas y también frente a las infecciones especialmente de tipo fúngico. Por esto, son normalmente las alteraciones fisiológicas y patológicas las que hacen inviable su comercialización mucho antes de que cese su actividad metabólica (Cuquerella, 1990).

La célula es un sistema altamente ordenado y estructurado y para constituirlo hay que suministrarle energía, ya que es un sistema dinámico (Berkaloff *et al.*, 1986). Todas las células, sin excepción, toman esta energía de metabolitos procedentes del exterior (sustratos respiratorios) y éstos son

degradados en las células, es decir, se transforman en compuestos más simples (en el caso del metabolismo aerobio a CO₂ y H₂O). En este proceso se libera energía, que se utiliza para formar compuestos ricos en energía acoplables a procesos endergónicos y de reducción que tienen lugar en el interior de las células.

La glucosa (C₆H₁₂O₆) es el sustrato de referencia de la respiración. Esta puede seguir, en los frutos separados de la planta, diferentes rutas metabólicas y la reacción global se expresa según la Ecuación I.1.:



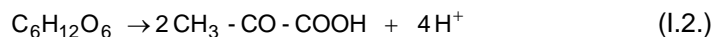
Teóricamente, cuando la glucosa se oxida totalmente, libera 2.880 kJ /mol, energía que es aprovechada por las células para sintetizar 38 moléculas de adenosín trifosfato (ATP). Como cada una de ellas tiene un $\Delta G = 32$ kJ, esto supone una energía total de $\Delta G = 1300$ kJ/mol, lo que significa un rendimiento del 40%, es decir, que se pierde el 60% de la energía en forma de calor (Guardiola, 1995). Sin embargo, estudios calorimétricos han demostrado que en la respiración de los tejidos vegetales tras su recolección, las pérdidas de energía en forma de calor son todavía mayores (90% o más), disminuyendo por tanto la síntesis de ATP. Este calor producido en la respiración es uno de los principales factores a tener en cuenta para el diseño de los sistemas de almacenamiento de frutas y hortalizas (Guardiola, 1999). En otras fuentes se cita que el valor de moléculas de ATP obtenidas de la oxidación completa de una molécula de hexosa fluctúa de 32 a 36 (Taiz y Zeiger, 1998).

El equilibrio entre el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono puede también variar en función de los procesos de oxidación y descarboxilación de otros sustratos (ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos) (Fennema, 2000). De esta forma, las frutas que en su respiración producen una gran cantidad de dióxido de carbono y consumen mucho oxígeno son las más percederas, mientras que las que tienen una baja actividad respiratoria, pueden almacenarse durante períodos de tiempo relativamente

largos. Además, manteniendo las frutas y hortalizas en condiciones de conservación que disminuyan su tasa respiratoria (refrigeración, atmósferas modificadas), es posible controlar considerablemente su vida útil.

La plena utilización de la glucosa implica durante el proceso de respiración dos secuencias de reacción fundamentales:

A) Glucosa–piruvato, vía la ruta de Embden Meyerhof Parnas (EMP) localizada en el citoplasma. Este proceso se puede resumir como (Ecuación 1.2.):



B) En el caso de la respiración aeróbica la segunda fase se realiza a través del ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbónicos (TCA) en que el piruvato pasa a dióxido de carbono, estando los enzimas localizados en las mitocondrias.

La importancia de las diferentes rutas oxidativas es distinta según las especies, los órganos y la ontogenia de la planta. Aunque la ruta metabólica más común es la glicólisis y el ciclo de Krebs, en determinadas circunstancias, las oxidaciones a través del ciclo de las pentosas fosfato pueden representar un tercio de la degradación de la glucosa, sobre todo en tejidos maduros (Berkaloff *et al.*, 1986). Tanto la degradación como la síntesis de glúcidos se realizan en vías metabólicas que parten de una molécula encrucijada común: la glucosa –6- fosfato.

LA GLICÓLISIS. VÍA DE EMBDEN Y MEYERHOF PARNAS

La glicólisis es una vía de degradación de la glucosa que tiene lugar en el citosol de la célula, en condiciones totalmente anaerobias, de forma que no requiere de oxígeno para llevar a cabo su objetivo: oxidar parcialmente la glucosa hasta formar dos moléculas de ácido pirúvico (Guardiola, 1995).

Las reacciones anaeróbicas de la glicólisis se realizan en dos etapas sucesivas, siendo necesario que la glucosa esté en forma de éster fosfórico para que pueda iniciar el proceso glicolítico. La glucosa es fosforilada por el ATP dando glucosa-6-fosfato, produciéndose una isomerización a fructosa-1.6-difosfato (Berkaloff *et al.*, 1986). En la etapa siguiente la fructosa difosfato se escinde, mediante una reacción aldólica, en dos moléculas de triosa fosfato: la fosfodihidroxiacetona y el fosfogliceraldehído. Estos son isómeros y la reacción de isomerización se produce de forma rápida y reversible, de forma que en el equilibrio el 96% está en forma de cetona, la cual se isomeriza a aldehído a medida que éste va siendo utilizado en la siguiente reacción.

Una vez se forma el fosfogliceraldehído, comienza la oxidación del mismo en presencia de la coenzima NAD^+ , que se reduce a NADH. Simultáneamente se produce una fosforilación del gliceraldehído-3-fosfato a ácido difosfo-1.3-glicérico, con un posterior cambio del grupo fosfato para formar 2-fosfoglicerato y de la formación del fosfoenolpiruvato por deshidratación del ácido 2-fosfoglicérico, generándose, después de una nueva fosforilación a nivel de sustrato, ATP y ácido pirúvico (Fig. I.9.).

Durante el proceso de degradación de la glucosa tiene lugar una ganancia neta de 2 moléculas de ATP, al mismo tiempo que la glucosa pierde 2 pares de electrones, afectados por el NAD^+ , para dar lugar a NADH. Como consecuencia se formarán dos moléculas de piruvato (Wills *et al.*, 1994; Guardiola, 1995).

Cuando el proceso de glicólisis finaliza, el NADH debe ser oxidado para poder ser utilizado en forma de NAD^+ , proceso que se puede llevar a cabo de dos formas: en condiciones anaeróbicas y en condiciones aeróbicas (Berkaloff *et al.*, 1986).

En condiciones anaerobias (fermentación) la oxidación se produce fermentando el ácido pirúvico en el citosol. El NADH se oxida aceptando como sustrato al piruvato para formar acetaldehído y etanol.

En el proceso se liberan 260 kJ/mol y la célula sólo aprovecha 64 kJ/mol, lo que supone un rendimiento del 25% (Guardiola, 1995).

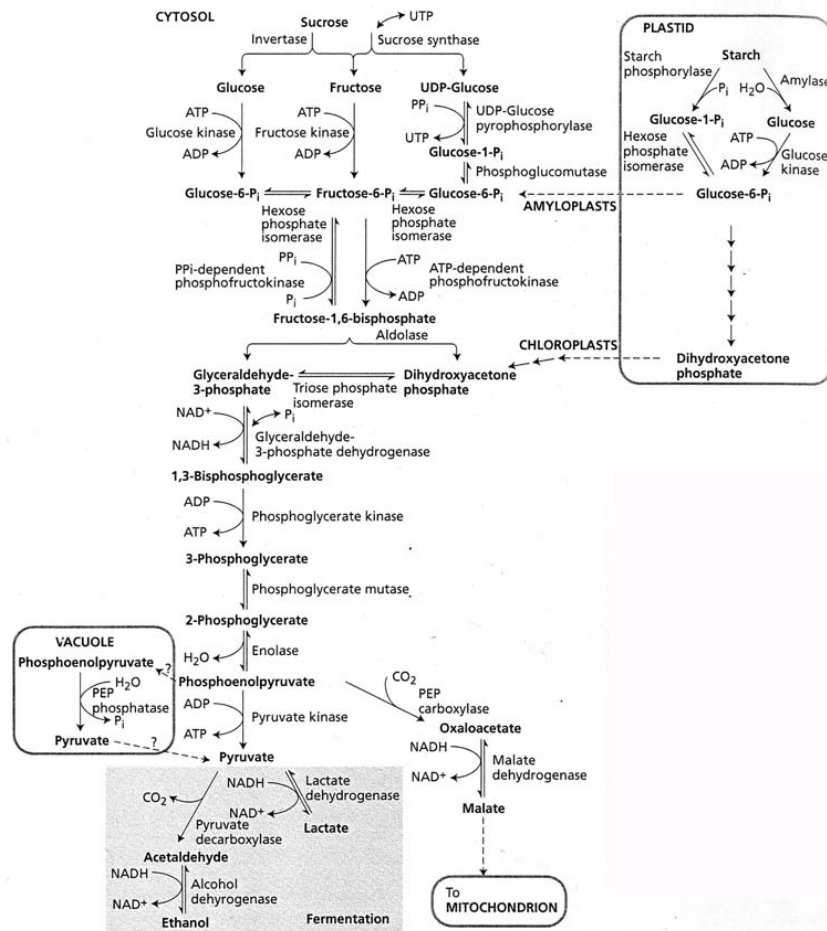


Fig. I.9. Las reacciones de la glicólisis y de la fermentación (Taiz y Zeiger, 1998).

En condiciones aeróbicas, la degradación del ácido pirúvico (oxidación y descarboxilación del piruvato que se realiza a través del ciclo de los TCA) tiene lugar en la mitocondria, de forma que el NADH es oxidado transfiriendo sus electrones al O_2 en lo que constituye la respiración mitocondrial o ciclo de Krebs. En el proceso se liberan 2.880 kJ/mol (686kcal /mol) de los que se

aprovechan aproximadamente 1.300 kJ/mol, que supone un rendimiento del 40% (Guardiola, 1995; Taiz y Zeiger, 1998).

Si la concentración de oxígeno en el interior del fruto es suficiente, tiene lugar un proceso respiratorio de tipo aeróbico, que se desplaza hacia la forma anaeróbica en una proporción tanto mayor, cuanto menores sean las posibilidades de aporte del oxígeno (Wills *et al.*, 1994).

EL CICLO DE KREBS. CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS.

El ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos se realiza en la matriz mitocondrial de la célula donde se oxida el acetil coenzima A o ácido acético activado (Taiz y Zeiger, 1998). En la matriz, este ciclo empieza por la formación del ácido cítrico, mediante la condensación del acetil-CoA con el ácido oxalacético. Seguidamente, el ácido cítrico es isomerizado a ácido isocítrico, que es entonces oxidado y descarboxilado en ácido α -cetoglutámico con reducción del NAD^+ . Una descarboxilación oxidativa en presencia de la coenzima A origina el succinil-CoA. En este proceso se desprende energía que se utiliza para acoplar la fosforilación de un nucleótido, el GDP y formar GTP. La energía acumulada en el GDP puede transferirse al ATP, de forma que todo ello lleva a la escisión del succinil-CoA en ácido succínico (Berkaloff *et al.*, 1986). La oxidación del ácido succínico conduce al ácido fumárico, que rápidamente es hidratado (consumo de una molécula de H_2O) para formar ácido málico, el cual se oxida dando lugar de nuevo a ácido oxalacético, que vuelve a reiniciar el ciclo (Fig. I.10.).

Por cada molécula de acetil-CoA que ingresa en el ciclo se obtienen 2 moléculas de CO_2 , 1 molécula de FADH_2 , 3 moléculas de NADH, 1 molécula de GTP transformable en ATP y queda libre una coenzima A que puede ser reutilizada.

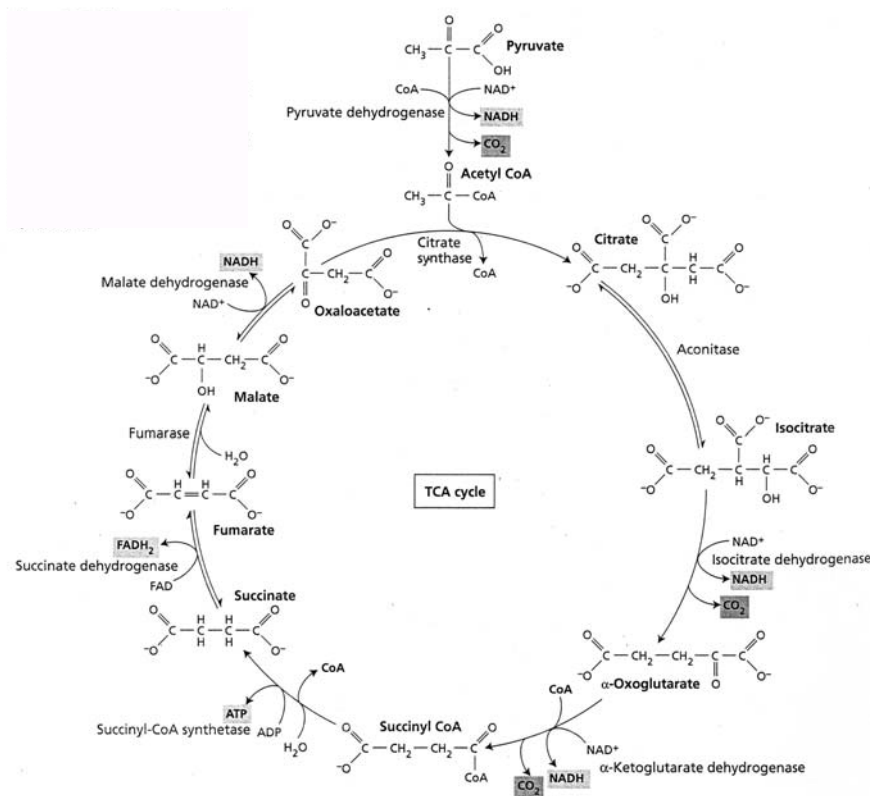


Fig. I.10. Ciclo de Krebs o ciclo de los TCA (ácidos tricarbónicos) (Taiz y Zeiger, 1998).

En la Fig. I.11. se puede observar que en las plantas, a diferencia de las células animales, en sus mitocondrias la enzima NAD^+ málica, que cataliza la descarboxilación oxidativa del malato permite operar en una vía alternativa para el metabolismo del PEP (fosfoenolpiruvato) derivado de la glicólisis, donde el malato es oxidado a piruvato que es a su vez oxidado vía el TCA, permitiendo la oxidación completa de ácidos orgánicos (malato, citrato, 2-oxoglutarato) en ausencia del sustrato normal del ciclo del TCA, el piruvato.

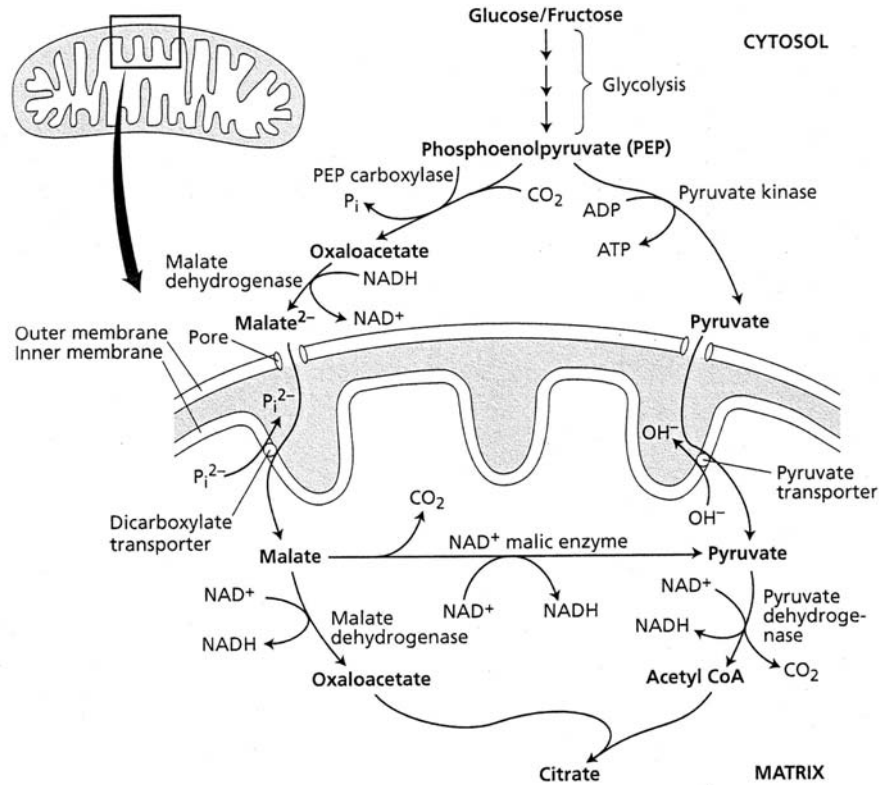


Fig. I.11. Rutas metabólicas en vegetales (Taiz y Zeiger, 1998).

Lo más importante del ciclo de Krebs en el metabolismo es la obtención de electrones de elevada energía (extraídos de la oxidación del acetil-CoA e incorporados a las coenzimas NADH y $FADH_2$), que junto a los electrones obtenidos en las otras rutas metabólicas, serán transportados por la cadena de transporte de electrones hasta el oxígeno para formar agua (Guardiola, 1995).

Como se puede ver en la Fig. I.11., el transporte de electrones se inicia cuando una molécula de NADH o de $FADH_2$ se oxida y cede H^+ y electrones a una de las moléculas que forman la cadena de transporte de electrones, situada en la membrana mitocondrial interna, formada por flavina y citocromos de diferentes proteínas (Taiz y Zeiger, 1998).

El transporte se realiza a través de una serie de reacciones redox, de forma que cada una de ellas hace intervenir a dos constituyentes de la cadena respiratoria con potenciales redox diferentes desplazándose los electrones desde el constituyente con menor potencial redox hasta el de mayor.

Las proteínas transportadoras están agrupadas en 3 complejos. Cada grupo posee un potencial redox más positivo que el anterior, de forma que los electrones descienden en cascada desde el NADH hasta los grandes complejos de enzimas situados en niveles energéticos cada vez menores, hasta que finalmente son transferidos al oxígeno (Taiz y Zeiger, 1998) (Fig. I.12.).

Entre las moléculas de la cadena respiratoria hay transportadoras de electrones y de hidrógeno. Cuando un transportador de hidrógeno es oxidado por un transportador de electrones, los H^+ quedan libres en la matriz, de forma que la disposición ordenada y fija de los transportadores en la membrana permite utilizar la energía liberada en el transporte de electrones para bombear los H^+ desde la matriz hasta el espacio intermembranal. Hay tres puntos en la cadena respiratoria en los que ocurre translocación de H^+ y que debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna, se acumulan en el espacio intermembranoso originando un gradiente electroquímico de H^+ , es decir, un gradiente de concentración, de pH y eléctrico (potencial de membrana), debido a la diferente distribución de H^+ a ambos lados de la membrana, y que son, el complejo I (deshidrogenasa), el complejo II (citocromo -b-c) y el complejo III (citocromo oxidasa) (Taiz y Zeiger, 1998).

Dada la impermeabilidad de la membrana interna, el retorno de H^+ a la matriz solo puede hacerse a través del ATP-sintetasa. Esta proteína utiliza la energía acumulada en el gradiente de H^+ para fosforilar el ADP y convertirlo en ATP. Este proceso es lo que se conoce como fosforilación oxidativa (Taiz y Zeiger, 1998).

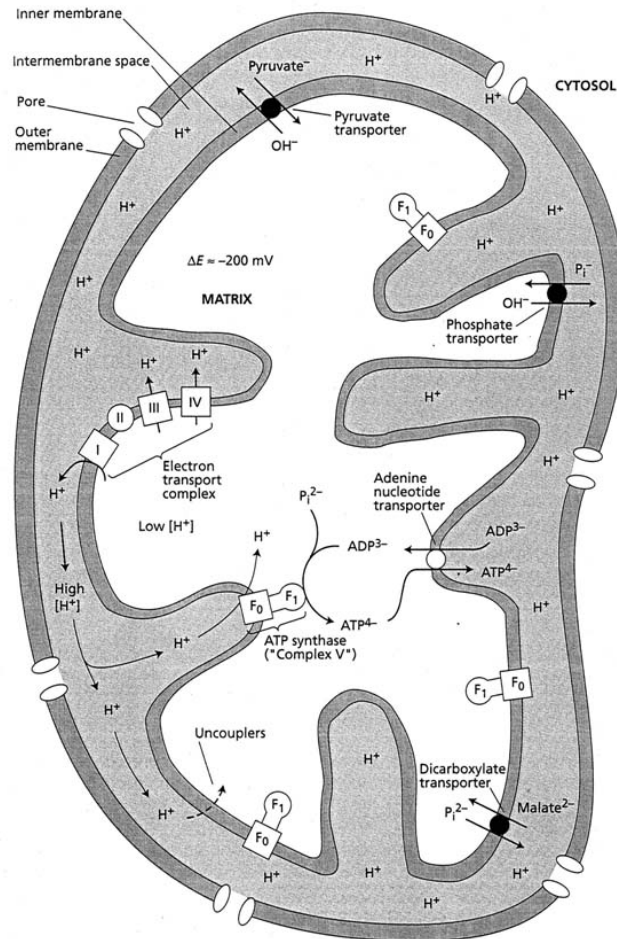


Fig. I.12. El gradiente electroquímico de los protones a través de la membrana interna de la mitocondria (Taiz y Zeiger, 1998).

Además, cada NADH que llega a la cadena respiratoria cede una pareja de electrones que en su transporte liberan energía suficiente para bombear 6H^+ desde la matrix al espacio intermembranal. Sin embargo, si los electrones proceden del FADH_2 , solo existe energía suficiente para bombear 4H^+ . Así, por cada 2H^+ que vuelven a la matrix a través de la ATP-sintetasa, se fosforila un ADP. Por lo tanto, en la cadena respiratoria se pueden obtener 3 ATP por cada

NADH obtenido en el catabolismo y 2 ATP por cada $FADH_2$ (Taiz y Zeiger, 1998).

I.3.2. Cociente Respiratorio

Para determinar la naturaleza del sustrato utilizado en la respiración se utiliza normalmente el cociente respiratorio (CR) que se define como la relación entre el volumen de anhídrido carbónico desprendido y el volumen de oxígeno absorbido por el fruto en un mismo tiempo.

Valores de CR próximos a la unidad, indican que los sustratos utilizados mayoritariamente en el proceso respiratorio son los hidratos de carbono (si es glucosa el sustrato que se está oxidando, el CR es 1,00), en tanto que la oxidación de ácidos orgánicos provenientes de las vacuolas, que pueden ser movilizados para su empleo por las mitocondrias como sustratos oxidables en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, da lugar a valores de CR superiores a la unidad.

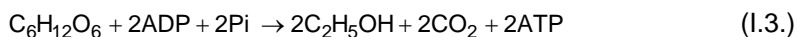
En la mayoría de los tejidos vegetales, en condiciones normales, el CR se encuentra en el entorno de 0,97-1,17, señalando una respiración oxidativa de carbohidratos como proceso dominante (Mohr y Schopfer, 1995).

En los cítricos, en atmósfera suficientemente oxigenada y a temperaturas inferiores a 25°C se obtienen valores de CR cercanos a la unidad. La oxidación de los hidratos de carbono exige en muchos casos una degradación enzimática previa de los carbohidratos de reserva, presentes en la mayoría de los frutos, a glucosa (Cuquerella, 1990). Por tanto, las modificaciones en el cociente respiratorio a lo largo del desarrollo y el almacenamiento pueden indicar el cambio del tipo de sustrato que está siendo metabolizado.

Bajo algunas condiciones de almacenamiento, el oxígeno atmosférico puede quedar considerablemente reducido y resultar insuficiente para un metabolismo plenamente aeróbico. En estas condiciones, los tejidos pueden iniciar una respiración anaeróbica en la que la glucosa se convierte en piruvato

por la vía EMP, el piruvato se transforma en ácido acético, ácido láctico o acetaldehído y seguidamente en etanol en el proceso denominado fermentación. La concentración de oxígeno a la que se inicia la fermentación varía con los tejidos y se conoce como punto de extinción o umbral fermentativo. La concentración de oxígeno del punto de extinción depende de numerosos factores, tales como la especie, el cultivar, el grado de madurez y la temperatura (Wills *et al.*, 1984).

La reacción global de la fermentación etílica es la siguiente (Flanzy, 1999) (Ecuación I.3.):



Cuando las células funcionan con esta vía metabólica y comienzan a producir etanol, la tasa respiratoria aumenta con el consiguiente aumento en la producción de CO₂. Esto es debido al bajo rendimiento energético que se produce bajo condiciones anaeróbicas (2 equivalentes de ATP por mol de glucosa frente a 36 equivalentes de ATP por mol de glucosa que se liberan en las rutas aeróbicas). Por lo tanto mucha más glucosa debe ser oxidada para mantener el nivel energético que la célula necesita (Kays, 1991).

Si bien la respiración anaeróbica produce mucha menos energía por mol de glucosa que la respiración aerobia, al menos permite poner a disposición del tejido cierta cantidad de energía en condiciones adversas. También produce metabolitos que son dañinos para el tejido vegetal como el etanol, el lactato, el acetato (Fig. I.13.) que si no se extraen rápidamente, la fermentación termina por envenenar a las células en poco tiempo (Mohr y Schopfer, 1995). En un mismo organismo pluricelular pueden darse tanto rutas aerobias como anaerobias, según las condiciones ambientales de sus células (IES, 2004).

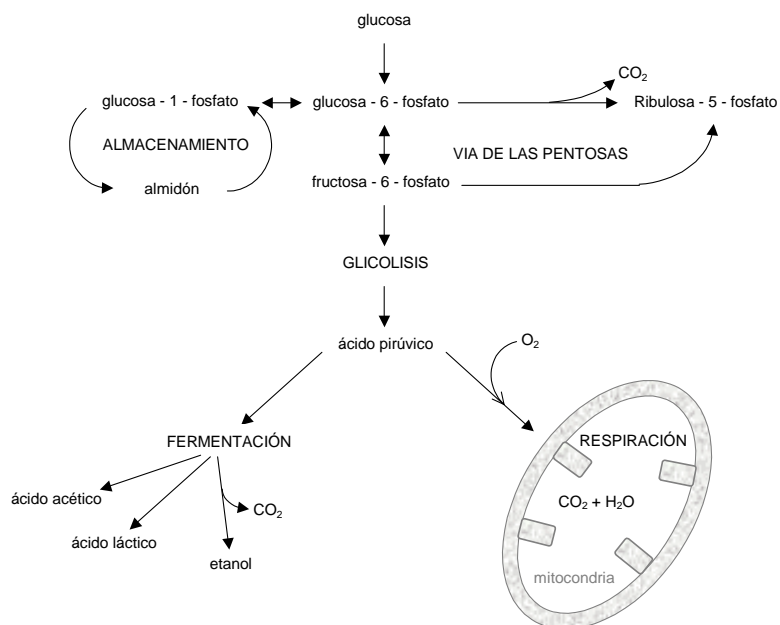


Fig. I.13. Rutas energéticas celulares (Berkaloff et al., 1986)

I.3.3. Compuestos volátiles

Todas las frutas, hortalizas y plantas sintetizan diversos y variados compuestos de bajo peso molecular (inferior a 250 kDa), volátiles a la temperatura ambiente. No son cuantitativamente importantes, generalmente los volátiles se encuentran presentes en cantidades extremadamente pequeñas (normalmente menos de 100 microgramos por gramo de peso fresco), pero sí lo son como responsables de las características aromáticas de las frutas y en menor grado de las hortalizas (Wills *et al.*, 1984).

La mayoría de las frutas y hortalizas contienen más de 100 especies volátiles, casi todas ellas en cantidades mínimas. Los componentes volátiles de los productos vegetales postcosecha representan un abanico muy amplio de compuestos químicos. Estos incluyen ésteres, lactonas, alcoholes, ácidos,

aldehídos, cetonas, hidrocarburos, algunos fenoles y éteres (Kays, 1991). Muchos de ellos, como el etanol, son comunes a todas las frutas y hortalizas (Wills *et al.*, 1984).

Los compuestos volátiles, componentes importantes y algunos de ellos imprescindibles para el aroma de los productos postcosecha se forman de tres maneras diferentes:

1) Muchos de ellos se forman naturalmente a través de enzimas que se encuentran en el tejido vegetal intacto por las siguientes vías biosintéticas: isoprenoide que origina los terpenos (limoneno por ejemplo); la vía del ácido shikímico que produce el alcohol benzilo, el benzaldehído y otros compuestos fenólicos; la beta-oxidación que representa una vía importante de producción de volátiles por oxidación de los ácidos grasos: ácidos oleicos, linoleicos y linolénico; la vía fermentativa que produce acetaldehído y etanol (Kays, 1991).

2) Un segundo grupo de volátiles se produce enzimáticamente tras un daño en el tejido vegetal. El daño celular permite que las enzimas y sus sustratos que previamente estaban aislados, interactúen (Kays, 1991).

3) El tercer grupo de volátiles se forma a través de una reacción química, que ocurre durante el proceso de calentamiento o cuando se cocina un alimento (Kays, 1991).

Los volátiles producidos en productos recolectados pueden verse alterados por varios factores, que incluyen el cultivar, la madurez, la estación, las prácticas de producción, de recolección, almacenamiento, maduración artificial y eventualmente los métodos de preparación de los productos. Debido a la importancia de los volátiles en la calidad del aroma y del sabor de los productos cosechados, los cuidados en el periodo de postcosecha deben ser máximos para minimizar cambios indeseables en la producción de volátiles. En el caso de los cítricos, si se recolectan en un estado inmaduro, esto puede tener un efecto negativo en su aroma y sabor (Kays, 1991).

El aroma de los frutos cítricos, es una compleja mezcla de compuestos volátiles. Los más característicos corresponden a ésteres y aldehídos, seguidos por alcoholes, cetonas e hidrocarburos (Baldwin, 1993). En estudios realizados en zumo de naranja fresco (Nísperos-Carriedo y Shaw, 1990), aplicando técnicas de análisis de espacio de cabeza, se han identificado alrededor de 20 componentes cuantitativamente importantes del aroma y sabor. De ellos, 8 son alcoholes, 4 aldehídos, 3 ésteres, y 5 hidrocarburos (Tabla I.3.).

Tabla I.3. Componentes volátiles (ppm) del aroma y sabor del zumo cítrico fresco (Fuente: Adaptado de Nísperos-Carriedo y Shaw, 1990).

COMPONENTE	RANGO (ppm)
ALDEHIDOS	
Acetaldehído	6,5 - 15
Hexanal	0,04 – 0,38
Octanal	0 - 0,04
ESTERES	
Etil Acetato	0,01 – 0,58
Metil Butirato	0,01 – 0,58
Etil Butirato	0,26 – 1,02
ALCOHOLES	
Metanol	10 -71
Etanol	75 -780
2-Metyl-1-Propanol	0 – 0,07
Hexanol	0,04 – 0,22
cis-3-Hexenol	0,06 – 0,65
trans –2-Hexenol	0,06 – 0,65
HIDROCARBUROS	
α - Pinene	trazas – 0,22
Sabinene	0 – 0,15
γ -Terpinene	0,04 – 0,46
Valencene	0,8 – 15,30
Limonene	22 - 67

En el caso de recolectar y medir los compuestos volátiles alrededor de frutos cítricos enteros intactos, se torna más difícil dada la pequeñísima cantidad en la que se producen (Norman, 1977).

Son pocos los investigadores que han estudiado el tema. Biale y Shepherd (1939) comprobaron que naranjas Navel, limones y pomelos en una atmósfera de nitrógeno (ambiente anaerobio) produjeron grandes cantidades de acetaldehído al transferirlos luego a una atmósfera de aire (ambiente aerobio).

Attaway y Oberbacher (1968) estudiaron los compuestos que contribuyen al aroma de naranjas "Hamlin" intactas, obteniendo 6 componentes mayoritarios: etil acetato, etanol, etil butirato, limoneno, etil coproato, etil caprilato. La presencia de etanol se sugirió que fuera debida a actividad microbiana.

Etanol, acetaldehído, metanol, etil acetato junto con el limoneno, α -Pinene y el β -mirceno fueron identificados como los volátiles mayoritarios producidos por limones California y naranjas Navel y Valencia. De todos los componentes identificados, en frutas intactas, solo el acetaldehído, el metanol, el etanol y el etil acetato han sido estudiados con relación a la calidad de almacenamiento de frutas frescas. La producción de las emanaciones volátiles de naranjas Navel fue medida durante su almacenamiento a 20°C durante 2 y 20 horas y durante 3 y 5 días en atmósfera de nitrógeno y luego de transferirlas al aire por más de 14 días. Las naranjas analizadas mostraron solo un pequeño aumento en la producción de acetaldehído bajo atmósfera de nitrógeno. Cuando las naranjas fueron transferidas al aire, la tasa de producción de acetaldehído aumentó de 5 a 10 veces, confirmando los hallazgos de Biale y Shepherd (1939). Luego, la producción de acetaldehído declinó rápidamente. La tasa de etanol aumentó durante el almacenamiento en nitrógeno, luego comenzó a declinar 4 a 6 horas luego que la fruta fue transferida al aire, disminuyendo aún más. La producción de etanol fue 600 veces mayor que la de metanol al día 5º en almacenamiento en nitrógeno. Todas las frutas que se almacenaron más de 20 horas en nitrógeno a 20°C exhibieron daño en la corteza y la tasa de producción de

volátiles nunca retornó a la que era previo al tratamiento, incluso luego de varios días en aire (Norman, 1977).

La emanación de volátiles en los cítricos se produce por un mecanismo complejo que responde a cambios en el entorno de almacenamiento. Las observaciones de que la producción de etanol, acetaldehído, metanol y el etil acetato difieren en aire y en nitrógeno, son importantes en la elucidación del metabolismo respiratorio de las frutas cítricas (Norman, 1977).

En cítricos el contenido en volátiles es función del cultivar, grado de madurez, espesor del recubrimiento, duración y temperatura de almacenamiento (Chalutz *et al.*, 1981; Cuquerella *et al.*, 1981; Norman, 1977).

La concentración de volátiles es mucho mayor en el espacio de cabeza del zumo que en las emanaciones de las frutas enteras (Norman, 1977).

Se pueden encontrar valores de etanol de 200mg /100 mL en zumo sin que se detecten malos sabores. En naranjas Shamouti enteras sanas, la concentración de etanol detectada fue de 0,4mg/kg h y la de acetaldehído de 0,1 mg/kg h (Pesis y Marinansky, 1990).

ACETALDEHÍDO Y ETANOL

El acetaldehído y el etanol se encuentran usualmente en frutas en cantidades traza pero comienzan a acumularse a medida que las frutas empiezan a madurar (Fidler, 1968; Paz *et al.*, 1981).

En casos en que se origina anaerobiosis en frutas, como por ejemplo cuando hay una infección fúngica, ésta puede conducir a que se produzca una mayor generación de estos metabolitos en la fruta atacada (Polevaya *et al.*, 2002), con la consiguiente aparición de malos sabores y olores así como una pérdida de textura (Kays, 1991).

El estrés que pudiera producirse durante el período de almacenamiento postcosecha puede ser causado por la composición gaseosa y la temperatura que rodea al fruto, afectando a la calidad del producto, ya sea de manera positiva como negativa (Kays, 1991). Un estrés gaseoso que actúa ralentizando la maduración y las fases de senescencia normales del ciclo vital de la fruta puede constituir un atributo positivo y es un mecanismo básico de uso muy común en el manejo postcosecha de muchos productos vegetales almacenados (Kays, 1991).

En el caso de un estrés gaseoso como por ejemplo una atmósfera controlada con bajas concentraciones de O_2 en almacenamiento, puede dar lugar a un tipo de respiración fermentativa que dé como resultado un aumento en las concentraciones de acetaldehído y etanol en el perfil de zumo cítrico, afectando negativamente a la calidad del flavor (Davis y Hoffmann, 1973; Pessis y Avissar, 1989; Davis, 1973).

El mecanismo bioquímico que opera en este caso es el siguiente: a muy bajas concentraciones internas de O_2 el aceptor terminal de electrones en el sistema electrónico de transporte, la citocromo oxidasa, cesa de funcionar. Esta enzima tiene una muy alta afinidad por el oxígeno y como consecuencia la inhibición no ocurre hasta que la concentración interna de oxígeno es menor del 0,2%. Cuando la inhibición ocurre, el 2NADH no puede ser oxidado a $2NAD^+$ y entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Como consecuencia de esto, el ciclo de los TCA también se inhibe, entonces, si bien la vía glicolítica no se bloquea, la misma tiende a la acumulación del ácido pirúvico el cual es convertido a acetaldehído que a su vez es reducido a etanol (es decir la respiración se desplaza hacia la vía fermentativa), siendo estos compuestos fitotóxicos para las células. En un sentido amplio dichos metabolitos pueden influenciar en la firmeza, el flavor y el color de la cosecha (Knee, 1991).

Específicamente, por un lado, la alta reactividad del acetaldehído se cree que causa la muerte de las células cuando se encuentra en altas concentraciones (Monk *et al.*, 1987).

Por otro, dependiendo de la concentración, el acetaldehído se cree que inhibe la maduración de algunas cosechas como la de tomate por ejemplo (Beaulieu *et al.*, 1997), de tal modo que la vida útil puede prolongarse por una aplicación externa de este compuesto (Pesis y Marinanski, 1997). En otras cosechas como la de peras y moras, la maduración se acelera con el acetaldehído (Beaulieu *et al.*, 1997). Por otro lado, el acetaldehído se conoce como uno de los muchos compuestos que determinan el flavor en la mayoría de las frutas (Pesis y Marinanski, 1997).

Cuando un tejido vegetal que está fermentando se lo transfiere de una atmósfera anóxica a una aeróbica, se produce un aumento en la producción de acetaldehído como resultado de la oxidación del etanol acumulado en el tejido durante la exposición en la atmósfera anóxica (Perata, 1991). Debido a la toxicidad del acetaldehído, este efecto se cree que es la causa principal del daño post-anoxia en plantas, más que por un alto nivel de concentración de etanol (Monk *et al.*, 1987; Perata, 1991; Jackson *et al.*, 1982).

La acumulación de etanol en las células como consecuencia de la fermentación, además de afectar la calidad del producto vegetal en sí (produciendo malos aromas, malos sabores) actúa interrumpiendo la continuidad de sus células, dañando las membranas, lo que puede llevar eventualmente a la muerte celular (Kiyosawa, 1975).

En estudios realizados sobre el contenido de acetaldehído y etanol en el zumo cítrico durante el crecimiento y el almacenamiento postcosecha, como una determinación adicional de la madurez de los mismos, se han encontrado diferencias varietales. A medida que la estación de crecimiento avanza, la concentración de etanol aumentó en el zumo de muchas variedades, pero en el momento de la madurez, el contenido de algunas variedades (tangerinas

Robinson y naranjas Temple) tuvieron baja concentración de etanol, pomelos Marsh tenían una concentración intermedia y las naranjas Valencia y Pineapple tenían altas concentraciones de etanol (Davis, 1971).

Puesto que los frutos cítricos una vez recolectados no maduran y tampoco mejoran su sabor y aroma, deben ser almacenados en condiciones en las cuales se puedan preservar adecuadamente las características de fruta fresca recolectada. Los efectos de ciertas condiciones de almacenamiento se ven reflejados en los cambios en la concentración de etanol en el zumo cítrico. Por lo tanto la determinación de este componente puede considerarse como un medio para evaluar la actividad metabólica de las frutas durante el almacenamiento (Davis, 1971).

Frente a una situación de estrés las concentraciones de acetaldehído y etanol pueden verse aumentadas, originando sabores y olores indeseables, texturas alteradas, decoloraciones, aumento de incidencias fisiológicas, cambios composicionales y pérdida de pigmentación que afectan la calidad del producto en cuestión (Cohen *et al.*; 1990; Schirra, 1992; Kays, 1991).

Es sorprendente no encontrar malos sabores con valores altos de etanol aunque en algunos casos se puede dar esta circunstancia, como en la variedad "Fortune" (Martínez-Jávega *et al.*, 1994). Como en naranjas "Caracara" con 235 mg/ 100 mL de etanol y en naranjas "Midnight" con 512 mg/100mL de etanol no aparecen malos sabores (Abad, 2003).

Cuando se producen fermentaciones etílicas, el CO₂ se produce en estado gaseoso mientras que el etanol aparece en estado líquido (OSHA, 2001) que en parte se volatiliza, encontrándose por ende en equilibrio con la fase gas en la atmósfera que rodea una fruta.

Muchos de los volátiles presentan un cierto grado de solubilidad en agua (Kays, 1991), como el etanol por ejemplo, que es uno de los constituyentes del aroma que se encuentran en la planta o el fruto como una mezcla binaria

líquido-gas completamente miscibles de dos componentes, en las que el etanol es más volátil que el agua, existiendo de esta manera en estado de líquido y en estado gas o de vapor (Chiralt *et al.*; 1998). Para otro de los componentes de los aromas como es el acetaldehído, el caso es similar (U.S. EPA, 1994).

I.3.4. Tasa Respiratoria

Se define la tasa respiratoria (TR) de un fruto como la cantidad de anhídrido carbónico emitido (TR_{CO_2}) o de oxígeno (TR_{O_2}) consumido por unidad de peso de fruta y unidad de tiempo.

Los cítricos están considerados como frutos con una tasa respiratoria débil, de entre 5 y 10 $mgCO_2/kg\ h$ para una temperatura de 5°C (Kader, 1985). Pero además, esta tasa respiratoria no es constante para los distintos tejidos que componen el fruto, existiendo un gradiente de crecimiento de la misma desde el interior hacia el exterior del mismo (Husseini, 1944).

Numerosos factores externos determinan la TR. La propia recolección así como la manipulación, estimulan la TR de los frutos cítricos (Parker *et al.*, 1984). También la temperatura juega un importante papel en la TR de los cítricos (Vakis *et al.*, 1970).

Como las posibilidades de conservación de un determinado fruto tras su recolección están en relación inversa con su actividad metabólica, la TR se considera con frecuencia un índice de su vida potencial de almacenamiento. Su regulación en frutas y hortalizas puede considerarse el resultado de la interacción de la vía glicolítica; de la vía fermentativa; del ciclo de los ácidos tricarbónicos y del sistema mitocondrial de transporte de electrones, presumiblemente a través de la influencia de la síntesis, degradación, inactivación y/o activación de las enzimas respectivas. Y de efectos antagónicos de la acción del CO_2 y del etileno, así como su influencia en el metabolismo secundario a través de una alteración del pH celular (Mathooko, 1996).

1.3.5. Métodos de Medida de la Tasa Respiratoria

Se pueden clasificar los métodos de la medida de la tasa respiratoria en los siguientes grupos:

MÉTODO ABIERTO O DINÁMICO

Consiste en hacer pasar una corriente de gas a través de un recipiente que contiene fruta. Determinando la diferencia de concentración de O_2 y /o CO_2 entre las corrientes de entrada y salida se puede calcular la tasa respiratoria (Dilley *et al.*, 1969; Lee *et al.*, 1991).

En general, la concentración de CO_2 y O_2 en la salida se mide por cromatografía de gases (Sekse, 1988; Lee *et al.*, 1991; McLaughlin y O'Beirne, 1999). Liao *et al.* (1982) utilizaron un analizador de infrarrojos para detectar el CO_2 y una celda de óxido de circonio para detectar el O_2 reportando que es un método más rápido que la cromatografía de gases.

Sin embargo, en este sistema pueden ocurrir errores sistemáticos debido a las dificultades en medir y controlar la tasa de flujo de aire. Así, Longheed y Franklin (1975) mostraron que diferentes tasas de flujo de aire a través de la cámara pueden influenciar la tasa respiratoria de los frutos y vegetales.

Además, como los cambios en la concentración de O_2 son muy pequeños con relación a la concentración en el aire, se torna más fácil medir la producción de CO_2 . Esta dificultad en medir los cambios en la concentración de O_2 puede dificultar la determinación del CR. Por eso este método es preferible para frutos con un índice respiratorio elevado, siendo necesarios tiempos de experimentación muy largos.

Por otra parte, el flujo de aire en torno del producto puede llegar a remover etileno y otros volátiles que pueden influir en la tasa respiratoria. Esto es muy diferente de las condiciones reales durante el almacenamiento comercial, donde las tasas de ventilación utilizadas usualmente son bajas.

MÉTODO CERRADO O ESTÁTICO

Consiste en colocar el producto en un recipiente impermeable y cerrado con una concentración de aire inicial conocida, midiéndose directamente los cambios en las concentraciones internas de O₂ y CO₂ que difunden hacia el espacio de cabeza resultantes de la respiración después de un determinado periodo de tiempo.

Este método sólo es útil para períodos de tiempo cortos, pues las variaciones que ocurran en la composición de la atmósfera como consecuencia de la actividad metabólica del fruto inducirán cambios en la velocidad de respiración y por tanto, los resultados no reflejarían la actividad del fruto en condiciones normales. Por este motivo, es un método de análisis más adecuado para productos con bajas tasas respiratorias, siendo menos exacto que el método dinámico.

Para cuantificar la tasa respiratoria existen varios métodos disponibles, unos basados en determinaciones directas por cromatografía gaseosa del CO₂ y/o O₂ presentes en muestras gaseosas del espacio de cabeza y otros en determinaciones indirectas a través del control de las variaciones de presión o volumen resultantes de la producción de CO₂ y del consumo de O₂.

Las determinaciones directas incluyen métodos químicos, como el uso de absorbedores de CO₂, titulando después el producto reaccionado (Bosset *et al.*, 1982). Otros investigadores han utilizado un reactivo tal como la lima que absorbe el CO₂ resultante de la respiración.

Los métodos físicos consisten en determinaciones indirectas al medir el cambio de presión o volumen producido en el sistema (Forcier *et al.*, 1987).

La ventaja de controlar las variaciones de presión o volumen es la simplicidad en los principios y el equipamiento involucrados. No obstante, normalmente están restringidos a pequeñas muestras de material y requieren manipulaciones prolongadas en el laboratorio.

MÉTODO PERMEABLE O ESTACIONARIO

Este método es similar al método estático con la diferencia de que se utiliza un envase semipermeable en vez de un recipiente cerrado. Tiene la ventaja de que mantiene el entorno experimentado por los frutos cuando son envasados, es simple, barato, y el tiempo y trabajo para llevar a cabo los experimentos puede ser inferior al de los métodos anteriores (Lee, 1987).

El sistema permeable es un sistema dinámico en que las concentraciones de O₂ y CO₂ cambian con el tiempo antes de alcanzarse el equilibrio. Ambas fases, no estacionaria y estacionaria, pueden ser utilizadas para estimar la tasa respiratoria de los productos, mientras que el método estático apenas utiliza datos no estacionarios y el método dinámico datos estacionarios.

Este método tiene la desventaja de que se pueden introducir más errores en los cálculos debido a que cada envase tiene una permeabilidad, área y volumen diferente. Además requiere más tiempo que el método dinámico (una semana aproximadamente) para alcanzar las condiciones de equilibrio. Y a veces puede ser difícil determinar con exactitud las concentraciones de gases en la fase de equilibrio, debido a grandes variaciones en los datos. En cualquier caso, si el material de envasado es elegido correctamente, este método parece ser más indicado que los anteriores (Lee *et al.*, 1996).

Beaudry *et al.* (1992), McGlasson, (1992), Cameron *et al.* (1995) y Christie *et al.* (1995), utilizaron bolsas de plástico permeables para determinar la tasa respiratoria en productos envasados con diferentes concentraciones de gases. Una vez que el envase alcanza el estado estacionario, el flujo de aire a través del film será igual a la tasa respiratoria del fruto. La tasa respiratoria puede ser calculada midiendo la diferencia de presiones parciales entre el envase y el ambiente, conociendo el área y la permeabilidad del film. Igualmente, se puede generar un rango de atmósferas variando el tamaño del envase o el peso del producto utilizado.

MÉTODOS AUTOMATIZADOS Y OTROS MÉTODOS

Con el tiempo y el avance de la tecnología se buscaron formas de automatizar los métodos tradicionales para facilitar y tornar más rápida la determinación de la respiración, así como se procuraron desarrollar métodos diferentes que no tuviesen las desventajas de los tradicionales y permitiesen determinaciones más simples, rápidas y más sensibles.

Así, Mannapperuma y Singh (1992) utilizaron el método dinámico con cromatografía de gases automatizando el sistema con el empleo de un conjunto de válvulas solenoides y un colector de gases. Las válvulas y el equipamiento de detección operan sincronizados por ordenador, llegando a utilizar 12 cámaras de vidrio. Las tasas de respiración pueden ser calculadas mediante balances de masa de O₂ y CO₂.

En 1982, Bosset *et al.*, describen otro sistema para determinar el consumo de O₂. El método consiste en una cámara hermética equipada con un sensor de O₂. El O₂ es inyectado automáticamente para mantener la atmósfera interna constante realizándose medidas periódicas de O₂ consumido. El método parece ser efectivo para medir el consumo de O₂, no obstante este sistema de medición es bastante complejo para uso general en laboratorio y requiere considerables habilidades de ingeniería para concretarlo.

Un sistema automático para medición continua de la tasa respiratoria de frutos y vegetales usando un analizador de gases de infrarrojos (IR) fue desarrollado por Mori *et al.* (1985). El sistema presenta las siguientes características:

- Realiza mediciones en los rangos de temperatura de 5-40°C y puede detectar variaciones de respiración asociadas con fluctuaciones de temperatura
- La influencia del CO₂ puede ser eliminada por un mecanismo especial incorporado en el sistema

- Dispone de un interruptor automático que le permite determinar simultáneamente la tasa respiratoria de 5 muestras y registrarlas como ppm de CO₂ emitido. El sistema permite determinar concentraciones de CO₂ en un rango de 1-100 ppm.

Forcier *et al.* (1987), diseñaron y desarrollaron un instrumento para medir la tasa respiratoria de frutos y vegetales enteros utilizando un método de variación de presión. Se utilizó el traductor de presión Motorola MPX-10-DP para controlar los cambios de presión debidos a la actividad respiratoria. Los valores de tasas respiratorias obtenidos con este método no mostraron diferencias significativas (para $\alpha < 0,05$) cuando fueron comparados con los valores determinados por cromatografía gaseosa.

En 1989, Park *et al.*, realizaron medidas automáticas de respiración y pérdida de peso durante el almacenamiento de frutos cítricos. Para ello almacenaron mandarinas (*Citrus unshiu* L.) a 10 y 20°C durante varios días siendo los datos capturados por microprocesador fácilmente controlable.

Andrich *et al.*, (1991), desarrollaron un modelo cinético que correlaciona la tasa respiratoria de los frutos con la presión parcial de O₂ ambiental (p_{O_2}). La p_{O_2} del sistema fue verificada por cromatografía de gases. El CO₂ producido fue recogido como BaCO₃ por lavado continuo del gas en una solución acuosa de Ba(OH)₂. El BaCO₃ precipitado fue removido por filtración y la concentración residual de OH⁻ fue evaluada por titulación. Para mantener una composición de gases constante dentro del reactor el volumen de CO₂ fue continua y automáticamente sustituido por O₂ puro, permitiendo así determinar la tasa de respiración de la muestra. La diferencia entre el CO₂ producido y el O₂ consumido permite detectar la actividad fermentativa eventual, proceso no detectado para concentraciones de O₂ elevadas ($p_{O_2} > 5\text{kpa}$).

Lee *et al.* (1997), llevaron a cabo investigaciones para mejorar y corregir el método de variación de presión tradicional (PMV) utilizando un sistema de microordenador y un sensor diferencial de presión. La presión de vapor de

agua en la cámara de respiración fue determinada a partir de ecuaciones psicométricas.

Bower *et al.* (1998), han desarrollado un método para medir la respiración y el cociente respiratorio de productos vegetales. El “respirómetro” consiste en una cámara hermética, en este caso de polimetacrilato, cuya atmósfera interna está controlada por sensores de CO₂, O₂ y temperatura conectados a un ordenador. El respirómetro mide la respiración en un sistema cerrado, por lo que para permitir mediciones continuas la atmósfera es automáticamente renovada por medio de una bomba de aire cuando el O₂ baja a una concentración específica. La sensibilidad de este sistema está limitada apenas por la precisión de los sensores. Además, pueden realizarse mediciones únicas en pocos minutos o programarse el equipo para controlar cambios en la respiración durante semanas. No obstante la falta de control del CO₂ es una de sus desventajas, porque en algún caso aumentos en su concentración por encima del 3% pueden llegar a afectar la respiración en algunos tejidos vegetales, manzanas y peras por ej. (Wills *et al.*, 1984); en cítricos, valores superiores al 3-4% según Kader y Arpaia (2000). Además, el sensor para este gas tiene que ser calibrado cada vez que se cambia de temperatura porque no compensa los cambios de densidad del gas con la temperatura y humedad.

Invariablemente, en todos estos métodos de la determinación de las tasas respiratorias se debe tomar en cuenta no sólo el proceso de respiración celular sino también el proceso de intercambio gaseoso (la resistencia de la piel a la difusión de gases; la solubilidad de los gases y la difusión de los gases dentro del producto) porque es la atmósfera que rodea al producto la que es medida.

En una descripción más detallada, el movimiento del O₂ y del CO₂ deriva de los siguientes pasos (Andrich *et al.*; 1991; Kader, 1987):

- i) Difusión del O₂ en la fase gas a través del sistema dérmico (estomas; lenticelas o interrupciones en el sistema dérmico)

- ii) Intercambio de O_2 a través de la atmósfera intercelular y la disolución celular
- iii) Solubilización y difusión de O_2 en solución dentro de la célula y membrana mitocondrial
- iv) Consumo de O_2 en la membrana mitocondrial
- v) Producción de CO_2 en la matriz mitocondrial
- vi) Difusión del CO_2 en la matriz mitocondrial hacia la disolución celular
- vii) Intercambio de CO_2 a través de la disolución celular y la atmósfera intercelular
- viii) Difusión del CO_2 en la fase gas a través de las aperturas del sistema dérmico hacia la atmósfera circundante

I.4. ALMACENAMIENTO POSTCOSECHA DE FRUTOS CÍTRICOS

La importancia del buen almacenamiento de frutas y hortalizas frescas deriva en constatar que el mal manejo en estado fresco puede acarrear pérdidas cuantiosas de productos cuya obtención ha requerido importantes inversiones de capital, maquinaria y mano de obra. Por esta razón, actualmente existe una tendencia en mejorar la conservación postcosecha más que a perseguir aumentar el volumen de la misma consiguiéndose así mayores beneficios en la calidad y sabor en los frutos así como también en los recursos (capital, mano de obra) disponibles. El aumento de la eficacia de las técnicas de conservación exige un conocimiento más detallado de la naturaleza y las causas de las pérdidas (tanto por alteraciones fisiológicas como fitopatológicas) entre la cosecha, la postcosecha y el consumo y disponer de mano de obra cualificada para las labores de postcosecha de las frutas y hortalizas (Wills *et al.*, 1984).

Las frutas y verduras son productos muy perecederos como consecuencia de su actividad metabólica incluso después de ser recolectadas. Su actividad respiratoria limita su vida útil en la etapa de postcosecha. Su vida útil, depende de numerosos factores, tanto biológicos: procesos naturales de respiración, producción de etileno y transpiración; como ambientales, principalmente, la temperatura, la humedad, y las concentraciones de gases en el ambiente, así como mecánicos: golpes y daños que se producen durante el proceso de recolección, almacenamiento y transporte (Wills *et al.*, 1984).

También se producen alteraciones fisiológicas durante el almacenamiento, como por ejemplo la aparición de infecciones fúngicas (Kays, 1991).

La calidad de los cítricos debe estar dada por la intensidad y uniformidad del color, firmeza, tamaño, forma, suavidad de la cáscara, ausencia de pudriciones y de defectos, incluyendo daño físico (abrasión y magulladuras), defectos en la cáscara o decoloración, daño por congelación y daño de insectos. La calidad del sabor está relacionada con la relación de sólidos solubles totales /acidez y la ausencia de compuestos que producen sabores indeseables, incluyendo metabolitos producidos por fermentaciones como el etanol y el acetaldehído. La temperatura óptima de conservación debe estar comprendida entre 3 y 8°C, pudiéndose conservar hasta 3 meses, dependiendo del cultivar, estado de madurez de la cosecha y área de producción. Algunos cultivares pueden ser mantenidos a 0 - 1°C (Infoagro, 2003).

La humedad relativa óptima de almacenamiento de las naranjas debe ser de 90 - 95% y la tasa de respiración debe estar comprendida entre los valores indicados en la Tabla I.4. (Arpaia y Kader, 2000).

La tasa de producción del etileno debe ser $< 0.1 \mu\text{L}/\text{kg h}$ a 20°C dado que la exposición a 1-10 ppm de etileno durante 1-3 días a 20-30°C puede ser utilizada para desverdizar naranjas. Este tratamiento no afecta la calidad interna (incluyendo relación sólidos solubles totales /acidez) pero puede acelerar el deterioro y la incidencia de pudriciones (Infoagro, 2003).

Tabla I.4. Valores de tasas respiratorias óptimas en naranjas almacenadas (Arpaia y Kader, 2000).

Temperatura (°C)	5	10	15	20
Tasa Respiratoria (mLCO ₂ / kg h)	2 - 4	3 - 5	6 - 12	11 - 17

Las bajas temperaturas reducen la transpiración y también la germinación de esporas y crecimiento de patógenos por lo que retrasan la desecación y la evolución de las podredumbres. También reducen la velocidad de ablandamiento y las pérdidas de acidez, vitamina C y características organolépticas (Cuquerella, 1999).

La aplicación del frío puede perseguir diversos fines: alargar el período de comercialización de variedades tardías aprovechando precios favorables, mantener la calidad durante el transporte a mercados distantes, tratamientos cuarentenarios para el control de insectos en frutos exportados a determinados países, servir de pulmón para abastecer la línea de almacén en momentos en que las condiciones climatológicas no permitan la recolección o conservar frutos en períodos de alto riesgo de heladas en campo. La humedad relativa debe estar cerca del 90%. La renovación de aire debe asegurar que el nivel de etileno sea inferior a 1 ppm. La duración del almacenamiento puede estar afectada por factores prerrecolección (patrón, condición del árbol, prácticas culturales, momento de la recolección, climatología) y postrecolección (retraso entre recolección y enfriamiento, tratamientos fungicidas, recubrimientos, etc) (Cuquerella, 1999).

Respecto a los efectos de la aplicación de atmósferas controladas (AC) a los cítricos, una combinación de 5-10% O₂ y 0-5% CO₂ puede ser beneficiosa en atrasar la senescencia y retener la firmeza, pero no tiene un efecto significativo en la incidencia y severidad de las pudriciones, las que representan el factor limitante en el almacenamiento prolongado de las naranjas. Niveles fungistáticos de CO₂ (10 -15%) no son utilizados porque dan

sabores indeseables debido a la acumulación de productos provenientes de la fermentación. El uso comercial de Atmósfera Controladas (AC) en el almacenamiento y transporte de naranjas es muy limitado (Infoagro, 2002).

I.5. PÉRDIDAS Y DAÑOS EN POSTCOSECHA

En relación con las pérdidas postcosecha que se producen en el mundo, por ejemplo, en USA, las pérdidas en los productos frutihortícolas perecibles, entre las fincas y los grandes centros de distribución se estiman entre un 2 a 23% del total del producto cosechado, con un promedio del 12% dependiendo del producto. En los países en vías de desarrollo estas pérdidas son dos a tres veces mayores (Falchi, 2001).

En Uruguay, en Manzana Granny Smith se halló que la fruta que alcanzó el mercado consumidor osciló entre el 40 y el 78% del total cosechado según la fecha de cosecha (Falchi, 2001).

En la cadena comercial, en el ámbito de los operadores mayoristas relevados, que concentran y distribuyen estos frutos a las cadenas de supermercados y al Mercado Modelo de Montevideo (Uruguay) y desde éste hacia las bocas de salidas minoristas, se observa que los defectos más citados para manzanas son los del tipo mecánico o físico como el machucón, daños en la piel y heridas o rajados en el fruto, junto a defectos biológicos como lo son los daños producidos por insectos durante el desarrollo del cultivo y daños internos del fruto (corazón acuoso o corazón mohoso), daños que se comienzan a detectar con decaimientos de la consistencia del fruto y desorganización de los tejidos de la pulpa del mismo (Falchi, 2001).

Generalmente el mayorista frutícola también desarrolla actividades de acondicionamiento y conservación en cámaras frigoríficas de estos frutos, por lo que su percepción de los defectos estará acentuada hacia aquellos que se manifiesten y detecten en las operaciones de clasificación y en las partidas que se conservan en cámaras frigoríficas. En el caso de los operadores minoristas

que adquieren las partidas de frutas de mayoristas, se parte de la base que reciben un producto tipificado y con algún grado de selección y presentación, por lo que las pérdidas que se originan en esta instancia se podrán deber a vicios o manipulaciones indebidas de los frutos en otras instancias de la cadena o a una mala conservación o disposición de estos frutos en el período que el minorista ofrece el producto. Aquí las pérdidas señaladas también se refieren a los defectos provocados por podredumbres y machucones que pueden manifestarse luego que la fruta ha permanecido un determinado tiempo en manos del minorista (Falchi, 2001).

Las causas reales en pérdidas postcosecha son varias pero pueden clasificarse en dos categorías principales:

1) La primera es la pérdida física de producto, que puede provenir del daño estructural o por ataque microbiano, que puede dejar el tejido degradado en un estado no aceptable para su presentación, consumo fresco o procesado (Wills *et al.*, 1998).

El daño físico también puede originarse por la evaporación de agua intercelular, que lleva a una pérdida directa de peso. Entonces, la pérdida económica resultante es debida primariamente al peso reducido de los productos que permanecen disponibles para el mercadeo, pero puede estar producida también por un rendimiento económico reducido debido a que todo un lote de productos ha sido rechazado por existir daños en algunos de los productos que lo componen (Wills *et al.*, 1998).

2) La segunda sería la pérdida de calidad de los productos que puede deberse a cambios fisiológicos y composicionales que alteran la apariencia, sabor o textura, haciendo que el producto sea menos apetecible para el consumidor final. Los cambios pueden provenir del metabolismo normal del producto o de eventos anormales que surgen del ambiente que rodea al producto cosechado y almacenado (Wills *et al.*, 1998).

La pérdida económica surge al tener que vender dichos productos a un precio reducido. En muchos mercados no hay demanda para este tipo de productos de segunda clase incluso a un precio reducido, lo que lleva a una pérdida económica total a pesar de ser aún comestible (Wills *et al.*, 1998).

En regiones tropicales, que incluye una alta proporción de países en vías de desarrollo, estas pérdidas pueden asumir una importancia económica y social considerable (Wills *et al.*, 1998).

En zonas desarrolladas como América del Norte, Europa, Australia y Nueva Zelanda, como el valor del producto fresco puede aumentar varias veces desde la granja al distribuidor, las consecuencias económicas del deterioro en cualquier punto son serias. Cuando las centrales están ubicadas cerca de pueblos y ciudades, las prácticas de postcosecha defectuosas son normalmente menos importantes pues los productos son consumidos normalmente antes de que sufran un daño serio por deterioro (Wills *et al.*, 1998).

En las regiones tropicales, sin embargo, la producción de algunos productos básicos puede ser estacional y existe la necesidad de almacenar los mismos para hacer frente a las demandas fuera de temporada. En los países industrializados y en países con un amplio espectro de climas, frutas y hortalizas frescas normalmente se cultivan en regiones alejadas de los mayores centros poblados. Miles de toneladas de productos son transportadas diariamente largas distancias dentro de los países e internacionalmente. Frutas y hortalizas frescas son artículos muy importantes del comercio, en los que las inversiones son muy altas en recursos como el transporte, almacenamiento y venta, diseñadas para mantener un suministro continuo de estos productos perecederos. La tecnología postcosecha aspira a proteger esta inversión al diseñar métodos por los cuales el deterioro del producto está restringido al mínimo entre el período de la cosecha y su consumo (Wills *et al.*, 1998).

A tales efectos es necesario tener un conocimiento detallado de la estructura, composición, bioquímica y fisiología del producto hortícola en cuestión, ya que la tecnología postcosecha aplicada tendrá como objetivo principal ralentizar la tasa metabólica sin inducir eventos anormales. Aunque existe una estructura y metabolismo común subyacente, diferentes tipos de producto varían en su respuesta frente a situaciones postcosecha específicas.

Las frutas en general y por ende, los cítricos, luego de su recolección presentan una serie de problemas derivados de la falta de aporte hídrico y de nutrientes desde la planta. Quedan entonces a expensas de su propio metabolismo y esto da lugar a una pérdida gradual de calidad de la fruta en sus características organolépticas de textura, sabor y aroma a medida que avanza su estado de senescencia y determina finalmente su muerte fisiológica (Cuquerella, 1990).

Este tipo de metabolismo limitado a sus propias reservas coloca además al fruto en una situación de debilidad frente a la deshidratación y las agresiones físicas externas tales como: fricción, golpes o heridas y también frente a las infecciones especialmente de tipo fúngico. Por esto, son normalmente las alteraciones fisiológicas y patológicas las que hacen inviable su comercialización mucho antes de que cese su actividad metabólica (Cuquerella, 1990).

En los frutos cítricos, se ha citado que la principal causa de deterioro fisiológico es el estrés de agua producido al separarse de la planta madre por la transpiración y falta de reposición de la misma.

En el caso de mandarinas se agrava más esta situación al ofrecer el fruto una alta relación superficie/volumen y menor espesor de corteza que facilitan la deshidratación. La transpiración no solo causa desecación, arrugamiento y ablandamiento sino que también acelera la senescencia (Cuquerella, 1999).

El evento anormal principal que surge en la postcosecha son los desórdenes fisiológicos que aparecen por diferentes razones como son las condiciones ambientales adversas precosecha y postcosecha a las que se someten los frutos; por desequilibrios minerales durante el crecimiento; por el deterioro causado por el ataque microbiano de bacterias y mohos que pueden infectar a los frutos ya sea en la precosecha o en la postcosecha (Wills *et al.*, 1998).

La susceptibilidad de los frutos a este tipo de desórdenes tras la cosecha está también influenciada por las prácticas culturales y condiciones climáticas durante su desarrollo o en el momento de la cosecha (Del Río y Martínez - Jávega, 1997).

La clasificación según los factores predominantes que las provocan es difícil de realizar por las interacciones que puede haber entre ellos. De todas maneras existen factores prerecolección y factores postrecolección.

I.5.1. Enfermedades causadas por hongos en la postrecolección de cítricos

Los cítricos son generalmente atacados por diversos hongos, especialmente desde el momento de su recolección hasta su consumo. Estos hongos producen una depreciación del producto, que en muchos casos se ha de desechar y no se puede comercializar.

Los hongos que producen mayores pérdidas son los hongos que pertenecen al género *Penicillium*. Otros hongos importantes son los de los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Geotrichum* o *Rhizopus* (Infoagro, 2003).

Los hongos que afectan a los cítricos tras la recolección, en la citricultura española y uruguaya en orden de importancia son *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Alternaria citri*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora citrophthora*, *Trichoderma viride*,

Trichotecium roseum, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotinium*, *Diplodia mutila*, *Phomopsis citri* (Infoagro, 2003).

El grado de ataque de estos hongos está influido por una serie de factores: ambientales (humedad relativa, temperatura, etc.), tejido vegetal (estado fenológico, presencia de heridas), hongo (cantidad y calidad del inóculo). En todos estos factores interviene el factor humano: momento de la recolección, método de conservación, la presencia de heridas debido al maltrato del fruto, presencia de inóculo en el almacén de campañas anteriores, etc. Para evitar esto, la cutícula y la epidermis del fruto debe de intentar mantenerse en las mejores condiciones, pues son las barreras de penetración para los hongos (Infoagro, 2003).

En España, según Martínez-Jávega *et al.*, (1999) en estudios realizados en diferentes campañas de comercialización de frutos cítricos se han identificado a los hongos responsables del podrido con los siguientes porcentajes: *Penicillium digitatum*-Moho verde-(55-80); *Penicillium italicum*- Moho Azul-(2-30); *Alternaria citri* y *A. alternata* (8-15); *Botrytis cinerea* (8-20); *Colletotrichum gloeosporioides* (2.5 -6); *Geotrichum candidum* (2-3); *Rhizopus stolonifer* y *R. Oryzae* (1-3); *Phytophthora citrophthora*-Pudrición Parda-(1-2) y (*Geotrichum candidum*)-Pudrición Agría (2-3).

Según Perucho y Tuset (2003), en la Comunidad Valenciana, durante las últimas campañas de comercialización previas al 2003, en los cultivares de naranja Navelina, Navelate, Salustiana, Valencia Late y Lane Late, la presencia de hongos fue bastante limitada. Aún así, *P. digitatum* continúa siendo el hongo más importante en postcosecha y es el responsable de la mayor parte de los podridos: 89,5% en frutos testigo conservados a T^a ambiente; un 94,3% en frutos procesados y conservados a T^a ambiente; 25,8% en frutos testigo conservados en cámara frigorífica y un 59,6% en frutos procesados y conservados en cámara frigorífica.

En el caso de *P. italicum*, en frutos testigo mantenidos a T^a ambiente la incidencia fue de 10,5%; en frutos procesados y mantenidos a T^a ambiente fue de 3,8%; en frutos testigos mantenidos en cámara frigorífica fue de 74,2 % y en frutos procesados y mantenidos en cámara frigorífica fue de 35,8%.

El resto de los hongos (*P. citrophthora* y *R. stolonifer*) tuvieron una incidencia mínima durante la campaña, apareciendo únicamente con una tasa de podrido medio del 1,9% en frutos procesados y conservados a T^a ambiente y del 3,7% en frutos procesados y conservados en cámara frigorífica, respectivamente.

En 1999, en la elaboración de un proyecto sobre postcosecha en *Citrus* en Uruguay, se mencionó que el 90% de los problemas sanitarios en destino de fruta cítrica, eran las podredumbres por *Penicillium* y que podían alcanzar al 2% de la fruta (Gravina, A, 2003).

Según Codina y Pastore (2003), en Uruguay, la incidencia de infección de cítricos uruguayos exportados en fresco en destino por *Penicillium* últimamente no supera el 1%.

I.6. TÉCNICAS ACTUALES DE DETECCIÓN DE DAÑOS EN POSTCOSECHA

La importancia de la producción hortofrutícola en los países productores como España, Uruguay y otros, tanto desde el punto de vista económico como social y cultural, exige una actualización continua de las labores de producción y de postcosecha del producto, de forma que permita su adaptación a unos mercados cada vez más competitivos y exigentes. La demanda de frutos de calidad por parte del consumidor obliga a dedicar más esfuerzos en los procesos tecnológicos de inspección, acondicionamiento y distribución de los mismos.

Actualmente, las operaciones de postcosecha previas a la inspección como son la descarga, lavado, encerado, secado y cepillado presentan un nivel

tecnológico satisfactorio, siendo las operaciones de clasificación y envasado de los frutos las tareas más críticas y determinantes de la calidad y de la capacidad de trabajo de una línea de confección y las que precisan de una mayor atención por parte de las iniciativas destinadas a conseguir incrementar el grado de automatización de las centrales (Juste y Moltó, 2003)

La disminución de los costes de los componentes electrónicos y el aumento considerable de sus prestaciones, hacen que la inspección automática del producto esté cada vez más introducida en el sector hortofrutícola español. Los sistemas automáticos de inspección no sólo permiten la selección de fruta a alta velocidad, sino también la aplicación de criterios objetivos de calidad que se mantienen constantes en el tiempo.

Las operaciones de selección automática de fruta deben tender a imitar los procesos que siguen los consumidores para detectar la calidad intrínseca de un fruto, así, añaden al aspecto exterior apreciaciones indirectas sobre su sabor, estado de madurez o tiempo de conservación, etc. De esta forma mediante los sentidos y a través del color, tamaño, presencia de manchas en la piel o, en algunos casos, palpando o produciendo un sonido, intentan determinar si el producto que se va a comprar es satisfactorio. Por este motivo, actualmente se intenta controlar la calidad de las frutas y hortalizas que salen del almacén a través del análisis más o menos automatizado de diversos parámetros físicos relacionados con la calidad del producto.

La seguridad e higiene alimentarias son asimismo atributos de suma importancia actual para los consumidores. A tales efectos, el sector de frutas y hortalizas procura mediante una serie de medidas cualitativas, algunas obligatorias como el reglamento de higiene y seguridad alimentaria y otras medidas que son de aplicación voluntaria como marcas de calidad, certificación de la empresa, etc. y la trazabilidad, que permiten asegurar la calidad del producto al consumidor (Juste y Moltó, 2003).

Los daños que afectan a los frutos se pueden reunir en dos grandes grupos. El que incluye todos los defectos que han tenido lugar antes de la llegada de la fruta al almacén, también conocidos como defectos "de campo" y el otro, denominado "de manipulación", que engloba los defectos producidos a los frutos desde su recolección y entrada en el almacén para su selección, hasta la salida de ésta para su consumo.

Entre los defectos "de campo" se pueden citar: los daños producidos por fenómenos meteorológicos; daños producidos por hongos causantes de diversas podredumbres; daños que se derivan de alteraciones fisiológicas o bioquímicas; daños producidos en la recolección y transporte. Entre los defectos "de manipulación" se encuentran: daños que se producen en las propias líneas de confección, provocados sobre todo por la inadecuada aplicación de desinfectantes, fungicidas y ceras, que causan serios defectos.

Se incluyen asimismo los daños mecánicos por rozamiento, choque o punción con diferentes elementos de las máquinas; daños de manejo en cámara de frío o desverdización y daños y podredumbres causados durante la conservación de la fruta en las cámaras frigoríficas.

Hay defectos que son más peligrosos que otros y que conviene detectar antes de su puesta en el mercado por su posterior evolución.

Para la identificación de daños externos y subsuperficiales, los métodos más utilizados se basan en sistemas de visión artificial (Moltó y Blasco, 2002) en los que se emplean cámaras con sensibilidad a la radiación visible, si bien en ocasiones dicha sensibilidad se ve ampliada al espectro infrarrojo o con iluminación ultravioleta.

Las centrales hortofrutícolas actuales cuentan con líneas de inspección de frutos en las que la mayoría del trabajo de clasificación recae sobre trabajadores temporales. La clasificación por tamaño se realiza mecánicamente aunque también se han introducido algunos sistemas ópticos para la

determinación del color global de los frutos. Sin embargo, la automatización de la identificación de defectos se encuentra todavía en fase inicial y en los pocos casos en los que se han implementado sistemas de este tipo se reducen a la detección de manchas oscuras en la superficie del fruto, sin llegar a distinguir entre los diversos tipos de defectos. Las cabinas de luz ultravioleta pueden utilizarse para detección precoz de podridos en períodos lluviosos.

La perspectiva y posibilidad de implementar sistemas automáticos de inspección en línea pasa por el reconocimiento de los tipos de daños que se dan en los frutos y por el desarrollo de metodologías que permitan caracterizarlos con un alto grado de fiabilidad. En este sentido, los sensores ópticos suministran datos relevantes para ser utilizados en un sistema de toma de decisión, de cara a una clasificación de la fruta según parámetros y características de calidad previamente definidas. En la actualidad se están probando e implementando máquinas calibradoras con sistemas automáticos de adquisición de imágenes en el infrarrojo cercano para la detección de daños en la superficie de las frutas en inspección en línea, de manera de clasificar la fruta por su calidad.

Actualmente en la detección de daños internos, se están utilizando diversas técnicas como es la tomografía de rayos X, que permite la adquisición de imágenes de secciones transversales de los frutos. Esta técnica se basa en las diferencias existentes en cuanto a la absorción de rayos X de distintos tejidos vegetales. Se ha trabajado en la detección de la calidad interna de varias frutas y hortalizas (cítricos, manzana, albaricoque, cebolla, col, etc.) utilizando escaners electrónicos industriales y obteniéndose buenos resultados, por ejemplo, para la detección del bufado en mandarinas y deficiencias hídricas internas de los frutos (Juste y Moltó, 2003).

También se está utilizando la resonancia magnética nuclear, basada en la medida de cambios en la magnitud de un campo magnético en función de la posición espacial. Existe la posibilidad de detectar regiones desecadas en el interior de naranjas e incluso determinar su cuantía. Esta técnica se puede

emplear para determinar la composición y la estructura interna de algunos alimentos para la industria de procesado, incluyendo la detección de lesiones en frutos, daños por larvas, estrés hídrico y oquedades; para la determinación del grado de madurez de un fruto con relación a su contenido en azúcar de una manera no destructiva. Permite medir variaciones en el contenido de agua del fruto y relacionarlas con su concentración de azúcares (Juste y Moltó, 2003).

Con las técnicas de láser o de espectrometría infrarroja se han obtenido buenos resultados en cebollas, manzanas, nectarinas y melocotones. Para los cítricos es dificultoso pues la corteza es muy gruesa y su contenido en azúcar no está bien relacionado con el contenido de azúcar de la pulpa. Otros parámetros medidos para estimar la madurez han sido la firmeza o los compuestos volátiles que definen el aroma de un producto, aunque las técnicas utilizadas están muy lejos de ser empleadas en las líneas de confección (Juste y Moltó, 2003).

Se está investigando actualmente en el desarrollo de sensores para obtener una medida objetiva de la calidad de las frutas, como sensores que miden la firmeza con metodologías no destructivas contrarias a las tradicionales que implican un daño a la fruta testada. El método más extendido es el de Magness-Taylor, basado en la resistencia a la penetración de un dispositivo cilíndrico en la pulpa. Debido a que es un método destructivo, se usa únicamente en muestras y no sobre toda la producción. Actualmente se está investigando en varios métodos no destructivos para la medida de la firmeza, basados en vibraciones, ultrasonidos o en la compresión de la fruta (Juste y Moltó, 2003).

Por ejemplo, el caso de un brazo rotatorio con una cabeza semiesférica que tiene un acelerómetro en su parte trasera. La liberación del brazo está ordenada por una célula fotoeléctrica que detecta la presencia de la fruta. La señal del acelerómetro permite la clasificación de la fruta en tres niveles de firmeza con la ayuda de un paquete informático específico. El índice de firmeza

se obtiene de la curva de aceleración contra el tiempo suministrada por el acelerómetro (Ortiz-Cañavate *et al.*, 2001).

Otros sensores de firmeza se basan en sensores de impacto a través de una célula de carga que registra el impacto de una fruta o mediante masas cilíndricas de acero que golpean ligeramente o caen sobre la fruta desde una altura determinada (Juste y Moltó, 2003).

Otro ejemplo es un método que consta de un multisensor desarrollado para la determinación rápida y no destructiva de la firmeza del mango. Se basa en un transductor con una película piezoeléctrica que detecta las vibraciones de una fruta cuando es golpeada suavemente con un péndulo de masa pequeña que tiene a su vez un sensor piezoeléctrico rígido. Las vibraciones de la fruta y la excitación del impulso incidente son analizados en línea brindando parámetros acústicos denominados como parámetros de firmeza (Shmulevich *et al.*, 2001).

Otra técnica que se utiliza en la detección de distintos tipos de daños es por ejemplo la imagen fluorescente de la clorofila que se emite cuando se produce la rotura de membranas al tratarlas con calor. Esta técnica permite aplicar tratamientos de calor monitoreando donde las membranas no están dañadas, manteniendo y mejorando de esta manera la calidad del producto (Van den Boogaard y Ruijsch, 2001).

La imagen de la fluorescencia "in vivo" como una herramienta de detección precoz de la infección fúngica en plantas (fresas) y frutas (limones) también se está utilizando. Dado que la vida de las plantas y la vida postcosecha de frutas muchas veces termina por la aparición del podrido causado mayormente por hongos, la detección tardía del patógeno y su esporulación incluso en una zona de la planta o en una sola fruta puede contribuir a su dispersión masificada causando aumentos en los gastos para su subsecuente control y pérdidas de producto. Utilizando diferentes protocolos ofrecidos por Fluorcam 690M, (P.S. Instruments, Brno, Czech Republic) se han medido los parámetros de la

fluorescencia específica y se han monitoreado fenómenos particulares de inducción de la fluorescencia. Sobre la base de diferencias en características individuales obtenidas en tejidos de hojas mientras se considera los cambios en la fluorescencia bajo condiciones fisiológicas normales y cuando las plantas han estado estresadas, se pudo distinguir entre áreas infectadas y áreas sanas mucho más pronto que por simple inspección visual. También se pudo distinguir la fluorescencia emitida en zonas infectadas de zonas sanas en limones. Se postula el potencial que tiene la medida de la fluorescencia para predecir el estrés biótico causado por un hongo microscópico en plantas de fresas y en limones en su estadio de infección temprana y eventualmente prevenir pérdidas significativas en la producción de frutas (Smatanova *et al.*, 2001; Soukupová *et al.*, 2001).

Esta técnica también se utilizó en las medidas de los atributos mecánicos y fisiológicos de la ciruela. Los cambios en la atenuación de la onda y la señal característica de estados diferentes de maduración son medidos y analizados. Los cambios en los parámetros acústicos se correlacionaron con atributos mecánicos e índices de su maduración fisiológica (Mizrach, 2001).

La evaluación sensorial se utiliza como otra herramienta en la evaluación de la calidad para productos hortifrutícolas de las que normalmente se utilizan tales como la medida de sólidos solubles totales; acidez y color entre otras. Dado que la evaluación sensorial puede llegar a resultar un procedimiento muy largo pues demanda mucho tiempo y además subjetivo, que también demanda una gran experticia, en la actualidad se están desarrollando aparatos electrónicos (narices electrónicas) que pueden proveer de métodos más rápidos y más objetivos para la evaluación de la calidad (Shaw *et al.*, 2000).

En cuanto a los sensores de aroma, la mayoría de la maquinaria de confección evalúa la calidad de la fruta básicamente a través del tamaño, color y aspecto de la misma. Sin embargo, para algunas especies como, por ejemplo, los melocotones o los melones, los consumidores también basan su decisión de compra sobre otros aspectos cualitativos, tales como la firmeza o el

aroma. Se ha utilizado la cromatografía gaseosa y espectrometría de masas para identificar los compuestos volátiles que se emiten naturalmente durante la maduración o la ruptura de la piel de algunas frutas. La importancia del estudio de estos compuestos se deriva también en el hecho de que, en muchos casos, se ha encontrado una relación clara entre el envejecimiento del producto y la cantidad de la emisión de algunos volátiles (linalool o el benzaldehído). Actualmente, se están desarrollando diferentes transductores de concentración de gases y la mayoría de ellos se basan en técnicas cromatográficas rápidas. Estas técnicas tienen una fiabilidad muy alta, pero presentan desventajas para su empleo en una línea: alto precio, difícil calibración y mantenimiento, compleja preparación de muestras, etc. También existen, aunque menos desarrollados, transductores que identifican los compuestos volátiles a través del análisis de su estructura estereoquímica mediante una serie de poli pirroles. Los transductores de estado sólido cambian su resistencia en contacto con diversos gases. Otros transductores adsorben las moléculas gaseosas y el aumento de masa que se consigue sirve para estimar la concentración de determinados compuestos (Moltó *et al.*, 1999).

Se ha investigado el uso de un detector laser fotoacústico de trazas de gases de CO (Monóxido de Carbono) (CO-laser-based photoacoustic trace-detection) para su aplicación en fisiología de postcosecha para detectar la aparición de acetaldehído y etanol. Consta de muy buena sensibilidad a tiempos cortos y opera con un sistema dinámico para la medida de la respiración. Se realizaron experimentos preliminares en pimientos rojos y manzanas (Oomens *et al.*, 1998).

Durante el almacenamiento o transporte de productos frescos, la calidad de los mismos puede estar monitoreada y controlada midiendo el ambiente que rodea al producto. Sensores para etanol y etileno pueden estar indicando que la maduración y el envejecimiento están ocurriendo. Un control preciso de la concentración de oxígeno en el entorno puede utilizarse para controlar estos procesos. Se ha desarrollado un sensor de oxígeno basado en la medida del

tiempo de luminiscencia que es dependiente del oxígeno (Van den Boogaard y Ruijsch, 2001).

Se ha investigado el uso de narices electrónicas portátiles para la detección temprana del podrido seco de la madera de construcción causado por el hongo *Serpula lacrymans* que ocasiona daños serios en las viviendas comprometiendo la seguridad de los edificios, para mejorar los métodos visuales existentes. Este hongo genera un olor especial que puede servir como marcador en el sistema, el cual provee de ventajas pues no es invasivo y permite un control inmediato "*in situ*" de la situación de la madera (Wareham *et al.*, 2000).

Asimismo se está utilizando la tecnología de narices electrónicas para evaluar la calidad aromática en peras y manzanas. Este aparato consta de 8 sensores de tipo micro balance que detectan cuando una masa de moléculas gaseosas es adsorbida sobre la superficie de cristal de cuarzo. La frecuencia de oscilación cambia en proporción a la cantidad de masa, mostrando que existen diferencias significativas en los espacios de cabeza de variedades de manzanas y peras estudiadas en función del tipo de almacenamiento comercial empleado y de los periodos de vida útil estudiados (Correa *et al.*, 2001).

Se ha investigado un sensor espectrométrico para la detección de aromas de frutos cítricos para desarrollar un robot frugívoro, utilizando la técnica de absorción iluminando con rayos infrarrojos. Dicho sensor consta de una fuente de rayos infrarrojos; un fotodetector sensible a las longitudes de onda de interés (aromas de los cítricos) y un filtro óptico de banda ancha, sintonizado en torno a la longitud de onda de absorbancia del gas (aroma) a detectar. En el futuro, el enfoque del proyecto será hacia el desarrollo de sensores biológicos reales bajo la forma de antenas de insectos amputadas colocadas en un circuito electrónico de monitoreo o tal vez con insectos enteros, ya que por ejemplo, la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) es atraída por el aroma de frutas deterioradas, de tal modo que podría constituirse en un sensor

biológico super sensible para futuros robots frugívoros a colocar en cámaras de almacenamiento (Wilkinson y Guanio, 1998).

I.7. MODELOS BIOLÓGICOS

Con el objetivo de ajustar algunos de los datos experimentales obtenidos en este trabajo a modelos matemáticos que sirvan como herramientas predictivas y de planificación, es de interés introducir en esta Tesis Doctoral el concepto de modelos biológicos.

Son métodos y expresiones matemáticas que describen y representan teóricamente los comportamientos temporales y espaciales de sistemas físicos, eléctricos, mecánicos (González, 2004) y biológicos, como por ejemplo: organismos; reacciones enzimáticas; grupos de organismos (poblaciones y comunidades) (Acerenza, 2004) bajo ciertas condiciones ambientales (factores intrínsecos como el pH, a_w) y extrínsecos (temperatura, atmósfera gaseosa) (Whiting, 1995).

La habilidad de describir a un microorganismo y sus procesos sobre productos biológicos conduce a la posibilidad de predecir, mediante la combinación de condiciones, frente a una carencia de datos experimentales alguna situación ambiental específica (Whiting, 1995).

En los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo de modelos matemáticos que describen el crecimiento de microorganismos como función de distintos factores de control. Los modelos matemáticos pueden ser usados para predecir los cambios en la calidad de los alimentos y para estimar la vida útil de los mismos (Wijtzes *et al.*, 1995).

Un modelo matemático es una expresión matemática que describe el crecimiento, la supervivencia, inactivación o actividad metabólica de bacterias patógenas como alteradoras de interés en los alimentos (Ingaramo *et al.*, 2002).

Las investigaciones en Microbiología Predictiva tienden al desarrollo de ecuaciones matemáticas que incorporen el efecto de factores críticos para el crecimiento, tanto intrínsecos (pH, actividad acuosa, concentración de cloruro de sodio y otras sales), como extrínsecos (temperatura y composición de la atmósfera gaseosa) (Skinner y Larkin, 1994).

Los modelos matemáticos permiten la detección de partes críticas del proceso y la descripción de la conducta de microorganismos bajo diferentes condiciones físicas o químicas (Cruz-Córdoba *et al.*, 2003), constituyéndose en una herramienta de gran utilidad en tecnología de alimentos, ya que permite analizar en forma cuantitativa el comportamiento microbiano en un determinado ambiente o sistema particular, es decir, permite realizar estimaciones cuantitativas, considerando la acción simultánea de diversos factores limitantes extrínsecos e intrínsecos; lo cual implica una gran ventaja, en tiempo y costo, comparado a los métodos utilizados tradicionalmente en microbiología de alimentos (Cayré *et al.*, 2001).

El modelado matemático es realizado, generalmente, asumiendo condiciones constantes para determinar los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento. Sin embargo, condiciones tales como temperatura, pH o composición de la atmósfera gaseosa no se mantienen constantes durante el almacenamiento refrigerado de los alimentos (Labuza y Taoukis, 1992). Debido a este hecho, en la actualidad el modelado matemático está orientado a la obtención de modelos dinámicos, es decir, modelos que permitan predecir la seguridad o vida útil de los alimentos bajo condiciones fluctuantes. Uno de los factores que más fluctúa es la temperatura de almacenamiento y es el más investigado (Roos y McMeekin, 1994).

En general los modelos utilizados en microbiología predictiva son empíricos o semiempíricos y se basan en regresiones lineales o no lineales.

Las variables de respuesta son en función de la naturaleza del problema estudiado (velocidad de crecimiento o muerte; probabilidad) y del modelo

elegido para describir la respuesta. Las mismas pueden ser el cambio en el número de microorganismos en el tiempo (fase lag, tiempo de generación, tiempo para alcanzar una concentración dada, tiempo de reducción decimal, etc.) donde la respuesta es modelada como "velocidad" (modelos de crecimiento o de muerte); probabilidad de que ocurra algún evento, por ej., crecimiento o producción de toxina (modelos probabilísticos).

Normalmente en este tipo de modelos existen varias etapas: una etapa de latencia (lag), en que la variable respuesta permanece constante; una etapa exponencial en donde se observa la mayor velocidad de crecimiento; una etapa estacionaria que implica que a medida que la población bacteriana aumenta se acumulan metabolitos tóxicos. Cuando su concentración es suficientemente alta, se produce también muerte y lisis celular. En esta fase, la velocidad de crecimiento es similar a la de muerte, si bien se siguen acumulando más toxinas. Y por último, una etapa de muerte en donde la velocidad de lisis y muerte supera a la de crecimiento.

Por niveles de actividad los modelos se clasifican en primarios, secundarios y terciarios.

Los modelos primarios se usan para describir como una población de bacterias cambia con el tiempo, en un ambiente determinado; esto es una expresión matemática que describe la curva de crecimiento (Neira, 1999). En la elaboración de modelos matemáticos, el modelado primario corresponde a la primera etapa ya que permite obtener información acerca de los parámetros de crecimiento bajo condiciones ambientales definidas y controladas. A partir del modelado primario se pueden deducir qué factores deberían ser tenidos en cuenta y qué rangos afectan el crecimiento de uno o varios microorganismos en un alimento en particular. Los modelos primarios permiten derivar parámetros primarios de crecimiento que se pueden utilizar en la construcción de modelos secundarios (Ingaramo *et al.*, 2002).

Los modelos secundarios describen la respuesta de los parámetros del modelo primario a cambios en las condiciones ambientales (a_w , T, pH, etc.).

Los modelos terciarios son rutinas de software que transforman los modelos primarios y secundarios en programas "amigables" para usuarios, desde un simple software de aplicación hasta sistemas expertos o programas de simulación de evaluación de riesgos.

Los modelos primarios y secundarios pueden ser lineales o no lineales, empíricos o mecánicos, cinéticos, pero en cualquier caso, las técnicas de regresión deben cumplir con los criterios estándar de: distribuciones normales y varianzas homogéneas; exactitud de ajuste; habilidad para predecir combinaciones de factores no testeadas; incorporación de todos los factores relevantes, poseer un número mínimo de parámetros para que sea fácilmente usable; especificación del término error; parámetros con significado biológico y valores realísticos; reparametrización para mejorar las propiedades estadísticas. Aunque estos criterios se cumplan, el modelado no será exitoso si no se parte de datos experimentales de buena calidad.

El verdadero valor de un modelo radica en cuán bien pueda predecir la respuesta microbiana en situaciones distintas a las que fueron testeadas para su planteo. Entonces, la validación es parte integrante del modelado microbiológico: después de coleccionar un número apropiado de curvas y plantear los modelos primarios y/o secundarios trabajando típicamente en medios de cultivo o en sistemas modelo de alimentos, se realizan nuevas experiencias y se contrastan los resultados con la predicción para evaluar la "bondad del ajuste" del modelo (esta etapa indicaría si hacen falta datos adicionales)- que consisten en la división del conjunto de datos en dos subconjuntos y en la omisión secuencial de algunos puntos. A continuación se compara la conducta microbiana predictiva en los medios de cultivo con el comportamiento en alimentos reales mediante ensayos de inoculación (esta etapa indicará las limitaciones del modelo y si las predicciones son pobres, la necesidad de considerar factores adicionales para hacer al modelo más aplicable).

Los modelos primarios de crecimiento se pueden separar en 2 grupos:

- a) Modelos de "tiempo para el crecimiento" o "tiempo para la producción de toxina". Ej.: Modelo probabilístico de crecimiento y producción de toxina de *Clostridium botulinum*.

- b) Modelos cinéticos de crecimiento. Ejemplos: Modelo de primer orden; Modelo de Gompertz; Modelo Logístico; Modelo de Baranyi y Roberts; Modelo de Richards; Modelo de Stannard; Modelo de Schnute; Modelo de Weibull.

CAPÍTULO II
JUSTIFICACIÓN e INTERÉS del TRABAJO

II. JUSTIFICACIÓN e INTERÉS del TRABAJO

Dada la importancia de la producción y del consumo de frutas (cítricos) en el ámbito mundial y local, presentada en la Introducción General, es cada vez más importante desde el punto de vista del almacenamiento y de la fisiología de postcosecha desarrollar métodos de prevención y detección de daños que permitan reducir el número de podridos que surgen en almacenamiento, optimizando la vida útil de las frutas almacenadas.

Habitualmente la detección de infección en las frutas que se encuentran conservadas durante largo tiempo en los grandes almacenes se realiza visualmente, hecho que implica muchas veces grandes pérdidas económicas por detectarse cuando ya no se pueden comercializar. Recientemente se ha comenzado con el uso de algunos dispositivos electrónicos (cámaras que utilizan los rayos de luz infrarrojos cercano) para la visualización de podridos, además de las cámaras de luz ultravioleta que se utilizan con frecuencia en almacenes.

Considerando que el ataque de los microorganismos y los daños mecánicos producidos en las frutas almacenadas entrañan una pérdida de producto muy importante que fluctúa entre un 12% en países desarrollados hasta un 24-48% en países en vías de desarrollo (Falchi, 2001), resulta de gran interés desarrollar métodos que puedan, por un lado prevenir la propagación de una infección y los efectos de golpes recibidos en la fruta almacenada, y por otro, detectar la presencia de daños (infecciones fúngicas y/o golpes) lo antes posible.

En especial, en los países productores y exportadores de frutas resulta muy importante tener la posibilidad de predecir una infección fúngica en la fruta almacenada antes de que la misma se desarrolle, con el fin de optimizar el mercadeo de las mismas.

El ataque de microorganismos a las frutas almacenadas y los golpes mecánicos que las mismas reciben -que a su vez aumentan la susceptibilidad de las frutas a ser atacadas por microorganismos (Kays, 1991)- implican

desarreglos fisiológicos en las mismas que pueden afectar a la respiración (Vines *et al.*, 1965; Woodward y Topping, 1972; El-Kazzaz *et al.*, 1983) y por ende a su vida útil.

Si bien los cítricos cosechados son tratados con fungicidas, las infecciones por mohos siguen produciéndose, siendo un fenómeno preocupante en todas las campañas, constituyendo los hongos del género *Penicillium* los más frecuentes (Perucho y Tuset, 2002). Dichas infecciones pueden estimular la producción de volátiles indeseables, como por ejemplo acetaldehído y etanol. Ello implica, en la mayoría de los casos, una alteración en la calidad de la fruta al producirse malos olores y sabores (Norman, 1977; Baldwin *et al.*, 1995).

En la mayoría de los casos los estudios de respiración (estimación del consumo de oxígeno y la evolución y producción de anhídrido carbónico) en frutas se realiza extrayendo una muestra gaseosa del espacio de cabeza del recipiente donde se ubica la fruta, ya sea trabajando en sistema cerrado, sistema dinámico o permeable, e inyectándola en un cromatógrafo de gases (Primo *et al.*, 2001; Fishman *et al.*, 1995; Zhu, *et al.*, 2001) para analizar la composición del mismo. Este proceso en varios pasos hace que sea muy laborioso, discontinuo, lento y a veces impreciso (Fonseca *et al.*, 2002).

Existen otros estudios realizados sobre la respiración de frutas con sensores que detectan oxígeno y anhídrido carbónico, que se ubican y conectan en los recipientes que contienen a las frutas (Bosset *et al.*, 1982). El grado de certeza de la medida de la respiración en estos casos queda determinado principalmente por la precisión de los sensores (Bower *et al.*, 1998).

Sobre la base de estas consideraciones, en este trabajo se desarrolla un sistema analítico, del tipo cerrado con el cual es posible estudiar la influencia de ciertas condiciones de estrés sobre las pautas respiratorias de frutas frescas. Frente a los sistemas existentes consultados en bibliografía su ventaja reside en la toma de muestra continua y los tiempos de análisis muy cortos (segundos).

CAPÍTULO III
OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral reside en el desarrollo de métodos analíticos que permitan detectar y/o predecir cambios fisiológicos durante el almacenamiento acaecidos en fruta fresca sometida a diferentes condiciones de estrés: cítricos dañados por inoculación artificial con esporas de los hongos *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer y manzanas sometidas a impactos mecánicos de intensidad creciente.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Desarrollo y puesta a punto de un sistema analítico con toma de muestra por aspiración automática, de manera continua y tiempos cortos de análisis para la medida de la respiración en frutas.
- 2) Planteo de un modelo matemático que permita la simulación de los flujos gaseosos producidos dentro del sistema, con ajuste de las condiciones óptimas de análisis: intervalos de tiempo entre renovaciones de aire de la atmósfera e intervalos de tiempo entre tomas de muestras consecutivas.
- 3) Pruebas preliminares de análisis de respiración de frutas sanas para ajustar el sistema analítico y modelo matemático propuesto.
- 4) Aplicación del método desarrollado en el estudio de los cambios fisiológicos en frutas cítricas inoculadas artificialmente con esporas de los hongos *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer, almacenadas en determinadas condiciones ambientales, para estudio de la influencia del ataque fúngico en la tasa respiratoria y en la aparición de volátiles indeseables en frutas infectadas.
- 5) Aplicación del método desarrollado para estudiar los cambios metabólicos sufridos por manzanas golpeadas en condiciones controladas. Estudio de cambios en otros parámetros físico-

químicos relevantes como posibles signos de detección de estrés mecánico

CAPÍTULO IV
PLAN DE TRABAJO

IV. PLAN DE TRABAJO

Para la ejecución de los objetivos propuestos, se planteó el siguiente plan de trabajo:

1) Diseño y puesta a punto de un sistema de análisis de tasas respiratorias de frutas enteras

Con la revisión bibliográfica efectuada en relación a los métodos de análisis de tasas respiratorias en frutas frescas, se diseñará y pondrá a punto un sistema de análisis de tipo cerrado.

2) Pruebas preliminares de análisis de respiración de naranjas (Navelate)

Una vez realizado el montaje del sistema analítico-experimental, se realizarán pruebas preliminares de respiración de naranjas Navelate sin procesar durante 8 días, a 21°C y 75,5% HR, para constatar que los resultados obtenidos son acordes con los datos recogidos en la bibliografía consultada.

3) Respuesta fisiológica de naranjas sometidas a un estrés fúngico

3.1. Caracterización de la materia prima

Las naranjas de la variedad Navelate utilizadas en esta parte del trabajo se caracterizarán previamente, analizando: peso, volumen, espesor y firmeza de pulpa, cantidad de zumo (%P/P), sólidos solubles totales, acidez total e índice de madurez.

3.2. Cultivo de los mohos para inoculación de frutas

A partir de liófilos puros de cepas obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *P. digitatum* Saccardo (cepa CECT 2954) y *P. italicum* Wehmer (CECT 2294), se cultivarán según protocolos del

CECT y del IVIA para obtener suspensiones de esporas para su posterior inoculación en la fruta.

3.3. Inoculación y almacenamiento de la fruta

Se inocularán naranjas Navelate provenientes de dos lotes con índice de madurez marcadamente diferente con esporas de los hongos *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer, en 4 puntos de inoculación por fruta en la zona ecuatorial con 25 µL de suspensión de esporas de concentración 10^6 CFU/mL en cada uno de los puntos.

Todas las frutas (junto con un lote control sin inocular) se almacenarán a la misma temperatura (21°C) y a humedad relativa muy próxima (75,5% y 85%).

3.4. Estudio de la respuesta fisiológica de las naranjas inoculadas

Tras realizar la inoculación artificial, se analizará el espacio de cabeza con la metodología propuesta durante 8 días de almacenamiento. Esto permitirá determinar los cambios ocurridos en la actividad respiratoria del fruto, así como la posible aparición de componentes volátiles característicos de metabolismos anaerobios.

3.5. Registro de signos visuales de infección fúngica

Paralelamente se registrarán los signos visuales de infección fúngica que aparezcan en la corteza de las mismas, durante los 8 días postinoculación.

3.6. Correlación entre parámetros analizados

Se desarrollará un modelo que intente explicar los cambios metabólicos como consecuencia del estrés aplicado, considerando las distintas componentes del proceso respiratorio y su relación con el crecimiento microbiano en superficie.

4) Respuesta fisiológica de manzanas sometidas a un estrés mecánico

4.1. Manzanas Granny Smith se someterán a impactos de intensidad controlada con un péndulo de propiedades físicas caracterizadas. La fuerza de impacto se ajustará asimilándola a las fuerzas que se citan en bibliografía como posibles de producirse en los almacenes de tratamiento postcosecha.

4.2. La fruta golpeada se almacenará en cámara frigorífica a 4°C analizándose cada dos días, distintas características, durante 7 días de almacenamiento.

4.3. Evolución de las tasas respiratorias en función de la intensidad del golpe, aplicándose la técnica de cromatografía gaseosa desarrollada anteriormente.

4.4. Evolución de propiedades mecánicas en función de la intensidad del golpe.

4.5. Evolución de parámetros de color en función de la intensidad del golpe.

4.6. Evolución del contenido en sólidos solubles en la zona afectada por el golpe en función de la intensidad del golpe.

4.7. Análisis de resultados.

CAPITULO V
RESPUESTA FISIOLÓGICA DE NARANJAS
SOMETIDAS A UN ESTRÉS FÚNGICO

V.1. INTRODUCCIÓN

V.1.1. EL PROCESO INFECCIOSO DE PATÓGENOS FÚNGICOS EN FRUTOS CÍTRICOS

Las enfermedades de la conservación de los frutos que originan el podrido se deben a:

1) Causas parasitarias, en las que el agente productor es siempre un hongo.

2) Causas fisiológicas, donde no existe un agente parasitario primario y su aparición se debe a factores internos al fruto o como consecuencia de una conservación defectuosa. Posteriormente y en un estado más avanzado de la enfermedad, agentes parasitarios secundarios (hongos, bacterias, insectos, nematodos, etc.) colaboran en la misma (Tusset, 1987).

Cuando un patógeno fúngico entra en contacto con algún órgano de una planta (frutas por ejemplo, su huésped potencial), inmediatamente un conjunto de factores que incluyen: humedad, temperatura, iluminación, susceptibilidad de los tejidos vegetales, interacciones con otros microorganismos presentes, agresividad del propio hongo, etc., van a determinar si el proceso de infección, o sea, la instauración del patógeno en los tejidos del fruto, se va a producir o no (Tusset, 1987).

En este proceso son muy importantes las condiciones del inóculo al que se define como cualquier unidad del patógeno potencialmente infectiva y que puede estar constituida por una o varias esporas, hifas, micelio, esclerocios, estomas de fructificación sexual o asexual u otro tipo de estructura del hongo capaz de iniciar una infección. En este proceso influyen a su vez: la cantidad, calidad y ubicación del inóculo.

El inóculo activo del hongo en contacto con los tejidos vegetales necesita superar una serie de transformaciones para poder efectuar la infección. Si está compuesto por esporas, el proceso a seguir es la germinación, siendo el

resultado final la formación de una pequeña hifa (tubo germinativo) que, ya sea por presión directa sobre la cutícula y epidermis, a través de discontinuidades de esta última provocadas (heridas y fisuras) o naturales (estomas y lenticelas) o también mediante reacciones enzimáticas que ablandan los tejidos epidérmicos, intenta introducirse en las capas internas de la corteza. Lo mismo ocurre si el inóculo está constituido por otras estructuras del hongo (generalmente micelio o esclerocios) (Tusset, 1987).

Los hongos desorganizan los tejidos del fruto mediante la actividad de las enzimas que segregan. Los más activos son las enzimas que degradan las sustancias pécticas pero también otras muchas están implicadas en la podredumbre.

Diversas especies de hongos, pertenecientes todos ellos a las clases Ficomicetos, Ascomicetos y Deuteromicetos, son las que provocan los podridos parasitarios en los frutos cítricos.

Dado que en esta Tesis Doctoral se ha trabajado con los hongos pertenecientes al género *Penicillium*, concretamente con las especies *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer, por ser los de mayor importancia económica con relación a los efectos dañinos que causan en las frutas cítricas almacenadas, se detallarán sus principales características morfológicas y sintomatológicas a continuación:

V.1.2. EL GÉNERO *PENICILLIUM*

Las especies pertenecientes al género *Penicillium* producen abundantes conidios o esporas. Técnicas simples como la dilución en placas o tubos de cultivo son satisfactoriamente utilizadas en el aislamiento de *Penicillia* de suelos u otros materiales. Se obtienen buenos resultados al ubicar substratos directamente en agar. Un procedimiento efectivo es realizar un aislamiento directo con una aguja estéril de un crecimiento visible de estos hongos (Pitt, 1979).

Como el género *Penicillium* está constituido por microorganismos aerobios, es generalmente insensible a la condición nutritiva de su entorno, muchos

medios utilizados comúnmente son satisfactorios para realizar un primer aislado. La única condición necesaria es que la competición bacteriana se minimice o se elimine y que exista una fuente de carbono adecuada. El medio más aplicado generalmente es el de extracto de maltosa agar por ser completo nutritivamente. Estas especies crecen en colonias muy compactas de manera que su requerimiento de carbono por unidad de volumen de medio de cultivo es mucho mayor que el de las bacterias u otros géneros de hongos (por ejemplo Hifomicetes) (Pitt, 1979).

Las temperaturas recomendadas para la identificación de los *Penicillium* son de 5°C, 25°C y 37°C por su eficacia y conveniencia, siendo muy común la incubación a 25°C. Las especies de *Penicillium* son las que crecen más fácilmente de todas las especies de hongos si se previene la contaminación cruzada en los cultivos. La temperatura recomendada de almacenamiento de los cultivos con micelio es de 1°C a 5°C, por ser muy accesible y no presentar problemas de contaminaciones menores (Pitt, 1979).

Dos especies, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* son patógenos importantes desde el punto de vista económico del género *Citrus* spp., encontrándose también en los suelos (Pitt, 1979).

V.1.2.1. *Penicillium digitatum* Saccardo

El nombre de la enfermedad causada por el moniliáceo *Penicillium digitatum* es la podredumbre verde, conocida en idioma inglés como "green rot".

Es una podredumbre blanda en el fruto que le hace perder con rapidez su forma, adquiriendo éste al final un aspecto de masa disforme. Al comienzo de la infección el área afectada por este hongo muestra un color más oscuro del normal y los tejidos pierden su consistencia firme, haciéndose más blandos (Tusset, 1987).

En la superficie de la lesión se desarrolla una tenue vegetación fungosa con aspecto de fieltro, al principio de color blanco (micelio) pero rápidamente cambia a una coloración que varía del verde-amarillo al verde oliváceo,

formada por las estructuras esporíferas. Los conidios (esporas) son secos y fácilmente separables de sus estructuras portadoras en forma de pequeñas nubes polvorosas (Tusset, 1987).

En una misma cadena de conidios se observan entre ellos marcadas diferencias en la forma y en las dimensiones (Fig. V.1.1.).

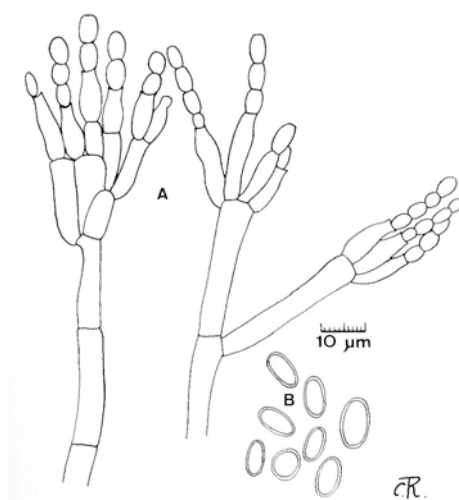


Fig. V.1.1. *Penicillium digitatum* Saccardo. A) Dibujos de Penicilos.

B) Dibujos de Conidios Maduros (Fuente: Ramírez, 1982).

Desde el punto de vista de la epidemiología el *P. digitatum* es un típico parásito de herida. Perdura en estado saprofitario sobre todo tipo de matriz vegetal, entrando en actividad cuando el fruto cítrico se encuentra en período avanzado de maduración o completamente maduro.

La contaminación de este hongo tiene lugar:

- a) En el campo, estando el fruto todavía en el árbol o en las operaciones de recolección y transporte.
- b) En el almacén acondicionador o conservador de la fruta.
- c) Durante el período de distribución y venta en los mercados.

Normalmente predomina el estado del enunciado a), es decir, durante la permanencia del fruto maduro en el huerto (Tusset, 1987).

La fuente principal de contaminación son los conidios, pero también el micelio puede jugar un papel interesante cuando los frutos están en contacto. Caso éste de frecuencia considerable durante el periodo de comercialización. (Tusset, 1987).

Una vez en los frutos, si éstos se encuentran maduros y presentan heridas o roturas de la cutícula y la humedad del aire es apropiada (más del 80%), los conidios de *P. digitatum* entran en actividad, germinan y el tubo germinativo en crecimiento, penetra con rapidez en el interior de los tejidos de la corteza (albedo), produciéndose la infección y al poco tiempo la podredumbre (Tusset, 1987).

Durante la conservación frigorífica *P. digitatum* es menos activo que *P. italicum*, predominando éste claramente en los frutos que sufren este proceso térmico. La razón de ello se debe a que el *P. digitatum* en condiciones de bajas temperaturas disminuye el desarrollo (especialmente la esporulación), lo que no sucede en *P. italicum* (Tusset, 1987).

V.1.2.2. *Penicillium italicum* Wehmer

El *Penicillium italicum* denominado también como "moho azul", conocido en idioma inglés como "*blue mold*" (Fig. V.1.2.), determina una podredumbre blanda en los frutos cítricos, cubriendo la parte externa de la zona del fruto afectada de una coloración azulada, variable entre el verde-azulado y el verde-grisáceo, debida a la formación de una capa de conidios (esporas) secos, fácilmente separables y que por su abundancia constituyen pequeñas masas polvorientas.

Al mismo tiempo que se forma en el exterior la parte reproductora asexual del hongo, los tejidos del fruto invadidos por el micelio del patógeno, se desorganizan como consecuencia de la disolución de las pectinas que constituyen las paredes celulares. Se producen pérdidas de líquidos, mostrándose al final éste blando y completamente arrugado. En condiciones de

temperatura igual o superior a los 8-10°C, esta podredumbre es rápida y continua, difundiéndose en todas direcciones hasta afectar al fruto completamente. Si ésta tiene lugar en atmósfera húmeda, el fruto se descompone blandamente con importantes exudados acuosos. Si por el contrario el ambiente es seco, el fruto se deshidrata rápidamente quedando al final arrugado y con aspecto coriáceo (Tusset, 1987).

Su morfología está determinada por los elementos constituyentes de la parte esporígena que son menores en tamaño a los del *P. digitatum*. El micelio es blanco. Los conidios son al principio típicamente cilíndricos y en la madurez elípticos o subglobosos, con paredes lisas, claramente hialinos, tomando un color ligeramente azulado cuando están agrupados en masa (Tusset, 1987).

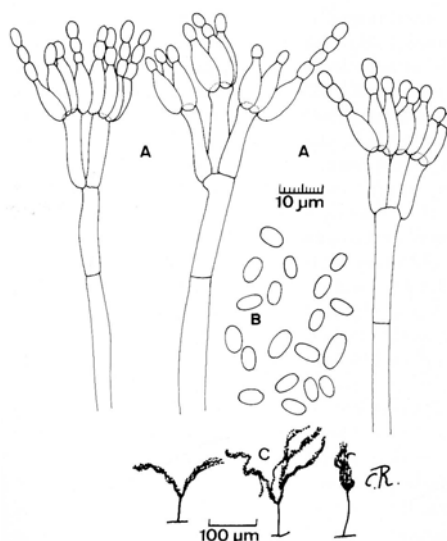


Fig. V.1.2. *Penicillium italicum* Wehmer. A) Detalles de Penicilos dibujados. B) Detalles de Conidios Maduros dibujados (Fuente: Ramírez, 1982).

En las condiciones ambientales que reinan en la Comunidad Valenciana el desarrollo y evolución del *P. italicum* es prácticamente idéntico al del *P. digitatum* (Tusset, 1987).

V.2. MATERIALES Y MÉTODOS

V.2.1. MATERIA PRIMA

V.2.1.1. Fruta

Las frutas utilizadas en los ensayos fueron naranjas dulces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) de la variedad Navelate, provenientes de la Comunidad Valenciana.

Los ensayos preliminares de ajuste de la metodología de la medida de la respiración se realizaron con 2 lotes (10 frutas en cada uno) inmediatamente después de cosechados (febrero 2002) cuyas frutas no recibieron tratamiento postcosecha.

En los experimentos de inoculación, se trabajó con frutas pertenecientes a otros 2 lotes: uno recién cosechado en el mes de febrero 2002 (lote 1) y otro en el mes de mayo 2002 (lote 2) procedente de una cooperativa local. Cada lote constó de 16 naranjas.

Una vez en el laboratorio, las frutas se manipularon con delicadeza, se lavaron con agua para eliminar suciedades, se secaron suavemente y se dispusieron en cajas de madera de manera que tuvieran buena aireación entre ellas, realizando su almacenamiento a 4°C. Previo a cualquier análisis se equilibraron durante 24 h a la temperatura seleccionada de trabajo (21°C).

V.2.1.2. Cultivo de las cepas de los mohos utilizados

Con el fin de evaluar la influencia de una posible infección en la tasa respiratoria y en la producción de volátiles indeseables (acetaldehído y etanol), se inocularon frutos cítricos con esporas de los mohos *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer, Para ello, se adquirieron cepas de hongos liofilizadas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT):

CECT 2294 - *Penicillium italicum* Wehmer, A.

CECT 2954 - *Penicillium digitatum*, (Persoon: Fries) Saccardo. A.

Se procedió a la recuperación de los liófilos según el protocolo elaborado por la CECT al respecto, que consistió en:

1) Abrir la ampolla que contenía al liófilo en condiciones estériles, añadirle 0,2 a 0,3mL de medio líquido adecuado, Agua de Peptona (CECT) y Agar Patata Dextrosa (PDA) (Plaza *et al.*, 2003; Smilanick *et al.*, 2003; Perucho y Tuset, 2003; Perucho y Tuset, 2002), con una pipeta Pasteur y resuspendirlo evitando la formación de burbujas de aire.

2) Sembrar un medio de cultivo sólido adecuado, PDA, con unas gotas de la suspensión obtenida y el resto de la suspensión añadirla a un medio líquido (Agua de Peptona y PDA), no empleando nunca medios selectivos en este punto. Se realizaron varios cultivos de esta suspensión, se incubaron a la temperatura óptima, 20°C en el caso de *P. digitatum* y 24°C para *P. italicum*, como mínimo 7 días (CETC.; Palou *et al.*, 2001).

3) Una vez crecidos, parte de estos cultivos se conservaron a 4°C considerándolos como cultivos "madre" a partir de los cuales es posible realizar la propagación.

Partiendo de algunos de estos cultivos "madre" se obtuvieron otros, trasvasando parte de ellos a otros tubos y placas que contenían el mismo medio de cultivo sólido (Patata Dextrosa Agar y Patata Dextrosa Agar pobre), u otros como el Maltosa Agar (MA) o Sabouraud Maltosa Agar, adecuados para el cultivo de mohos, generando así una colección de estos hongos de donde *a posteriori* se pudieron extraer esporas para efectuar las suspensiones y proceder a la inoculación artificial de las frutas.

Mientras no eran utilizados, los cultivos se mantuvieron siempre a 4°C, de modo de mantenerlos vivos pero a una velocidad de propagación muy ralentizada.

En la Fig. V.2.1. se observan imágenes de algunos de los cultivos en PDA.

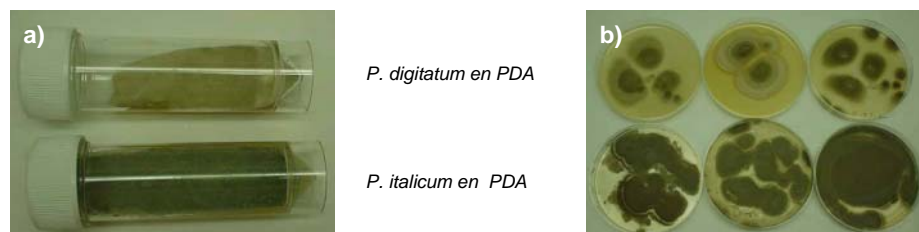


Fig. V.2.1. Cultivos de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* en tubo: (a) y en placas (b) logrados a partir de liófilos puros obtenidos de la CETC.

Parte de las placas y tubos conteniendo medios de cultivo (Potato Dextrosa Agar, Potato Dextrosa Agar Pobre y Maltosa Agar) se prepararon en el Laboratorio del Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). El resto (PDA y Sabouraud Maltosa Agar) fue elaborado en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la UPV.

V.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

V.2.2.1. Peso

Se pesaron las frutas en una balanza analítica de precisión de sensibilidad 0,001g, modelo Mettler Toledo PG 503-5, máx. 510g.

V.2.2.2. Volumen y superficie

Para calcular el volumen se utilizó el método de desplazamiento de agua según Mohsenin, (1981).

La determinación de la superficie de la fruta se realizó a partir del volumen de la naranja calculado anteriormente, considerando esta como una esfera.

En el caso del cálculo de las medidas de volumen y superficie de las frutas en los experimentos de inoculación con esporas de *Penicillium*, el método de Mohsenin presentaba el problema de que al sumergir la fruta en el agua destilada, los microorganismos inoculados pueden resultar barridos y eliminados, alterando el resultado experimental. A los efectos de resolver de la

mejor manera posible esta dificultad, se calculó el volumen de las frutas asociándolas con un cuerpo elipsoide (Ec. V.2.1.), dado que muchas veces los frutos cítricos presentan dicha forma.

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c \quad (\text{V.2.1.})$$

Donde a y b son los dos radios longitudinales de la elipse separados por un ángulo de 90° y c es el radio ecuatorial, todos ellos expresados en centímetros (cm).

Todos los parámetros se obtuvieron de los diámetros medidos con pie de rey o calibre milimétrico con lectura digital, precisión de 0,01 mm, por triplicado, realizando la media de cada uno de los tres.

V.2.2.3. Resistencia mecánica o firmeza

La medida de la firmeza de la pulpa fue realizada con un penetrómetro manual (Valero y Ruiz Altisent, 2000; Mazzuz, 1996).

El penetrómetro utilizado en los análisis fue de diámetro del vástago metálico de 8,07 mm, del tipo Penetrometer Fruit Pressure Tester FT 327 (kg), precisión ±1% escala completa a 20°C, dentro de la fruta.

La medida se efectuó en tres puntos diferentes de la zona ecuatorial de la fruta, registrando luego la media de estos tres puntos.

V.2.2.4. Espesor de la corteza

Se realizó directamente con pie de rey o calibre milimétrico con lectura digital, precisión de 0,01 mm, sobre lados simétricos de la corteza en la fruta seccionada transversalmente a la altura del ecuador, registrando medidas por triplicado y expresando la media de los puntos (Fig. V.2.2.).



Fig. V.2.2. Medida del espesor de la corteza de las frutas.

V.2.2.5. Porcentaje de zumo

Se realizó por extracción con exprimidor comercial de uso doméstico y filtración en tamiz de 1mm de diámetro de luz para separar las semillas, las pieles y la pulpa demasiado gruesa.

El resultado se expresa en porcentaje (peso zumo / peso de fruta).100 (Mazzuz, 1996).

V.2.2.6. Sólidos solubles del zumo

La determinación de los sólidos solubles del zumo extraído de las naranjas analizadas se realizó mediante la medida del índice de refracción (Mazzuz, 1996), en un refractómetro ABBE (ATAGO modelo 3T, sensibilidad 0,01 Brix) con control de temperatura. Se efectuaron tres lecturas de cada muestra, colocando unas gotas del zumo obtenido. Se expresó el resultado como el valor medio de las tres lecturas en °Brix.

V.2.2.7. Acidez en zumo

Se determinó según el Método Oficial 942.15 (AOAC, 1995) para la determinación de la acidez valorable en derivados de frutas. El mismo se basa en la valoración del zumo con una solución de NaOH 0,1 N e indicador de fenolftaleína. Se asume que 1 mL de NaOH (0,1 N) neutraliza 0,064 g de ácido cítrico. La valoración fue controlada mediante un pH-metro hasta un pH de 8,1-8,2.

Los resultados se expresan como gramos de ácido cítrico por 100 mL de zumo. La medida de acidez se realizó por triplicado, expresando como resultado final la media de los tres.

V.2.2.8. Índice de madurez

Está representado por el cociente entre el contenido de sólidos solubles totales, como grados Brix y el contenido en ácidos orgánicos totales, representado por los mililitros de ácido cítrico en 100mL de zumo.

V.2.3. INOCULACIÓN DE LAS FRUTAS CON ESPORAS DE *Penicillium*

A partir de los cultivos de *Penicillium* obtenidos se inocularon las frutas. Para ello, inmediatamente antes de la inoculación se prepararon las suspensiones adecuadas.

Dado que las esporas de los hongos son muy hidrófobas y tienden a contaminar todos los ambientes, para realizar las suspensiones se prepararon previamente disoluciones de 1 gota de Tween 80^R por 100 mL de agua destilada.

El compuesto Tween 80^R QP (Polioxietileno Sorbitan Monooleato) de la marca Sigma, al ser un detergente no iónico, soluble en agua, sus partes hidrofóbicas cubren las partes hidrofóbicas de las esporas, generando micelas, humidificándolas suavemente al bajar la tensión superficial entre las mismas y el agua y haciendo a las esporas más pesadas para prevenir que las mismas se dispersen una vez abiertas las placas y los tubos de cultivo que las contienen, (CETC.; Plaza *et al.*, 2003; Palou *et al.*, 2001; El Gaouth *et al.*, 2000 a; El Gaouth *et al.*, 2000 b).

En condiciones de esterilidad durante todo el proceso, se añadió al tubo de cultivo en medio sólido (Patata Dextrosa Agar; Maltosa Agar) que contenía al hongo en cuestión, un poco de disolución de agua destilada más Tween 80^R esterilizada. Se agitó de forma que las esporas se suspendieran en la solución y se trasvasó la misma a un tubo de vidrio limpio.

A partir de esta suspensión inicial a la cual se le aplicó una agitación mecánica fuerte por medio de un *Vortex* (marca Heidolph Reax 2000) (Scerra *et al.*, 2000) para obtener una dispersión y distribución homogénea de las esporas suspendidas, se procedió a ajustarla realizando sucesivas diluciones (a la cual también se les aplicaba agitación mecánica por *Vortex*). El ajuste se llevó a cabo mediante recuentos en cada una de ellas con un Hemocitómetro (placa cuenta glóbulos) también denominada placa *Thoma*, (Brand, Germany de profundidad 0,1mm, cuadrícula doble y con una superficie de los cuadrados pequeños de 0,0025 mm²). Se colocaron alícuotas tomadas con pipetas Pasteur largas (230mm) de vidrio (Normax), esterilizadas previamente, de las distintas suspensiones realizadas en el hemocitómetro y se observaron mediante microscopios ópticos: Nikon Optiphot – 2 y Leica DMLM Linkan LTS350. Por recuento se consiguieron concentraciones de la suspensión de 10⁶ esporas/mL (Pao y Brown, 1998; Morris y Nicholls, 1978; Porat *et al.*, 2000; El-Ghaouth, 2000; Plaza *et al.*, 2003).

De estas suspensiones, se tomaron alícuotas de 120µL para inocular a cada fruta. Se realizó un orificio en la corteza (Figura V.2.3.) con una aguja de acero inoxidable de 1 a 2 mm de profundidad (penetrando el albedo pero sin llegar a las vesículas de zumo), simulando una inoculación natural (Palou *et al.*, 2001; Porat *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2000; Ipólito *et al.*, 2000; El-Ghaouth *et al.*, 1999; López-García *et al.*, 2000) en 4 puntos equidistantes del ecuador de la naranja, inyectándose 25 µL en cada uno de ellos por medio de un puntero de plástico. Esta operación se realizó siempre en presencia de un mechero encendido a los efectos de garantizar condiciones experimentales adecuadas.



Fig. V.2.3. Orificio de punción e inoculación en la corteza de naranja.

V.2.4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA

V.2.4.1. Sistema de análisis

De la revisión bibliográfica realizada (Introducción General, Punto I.3.5.) y posterior discusión de los distintos sistemas experimentales utilizados por otros autores, se decidió implementar un sistema de análisis de tipo estático o cerrado, conectado a un microcromatógrafo de gases con toma automática de muestras.

El sistema consta de dos componentes fundamentales:

- 1) Cámara de respiración o respirómetro, donde se ubicará la fruta a analizar.
- 2) Un micro cromatógrafo de gases (mCG) con las siguientes características:
 - a) Toma automática de muestras por aspiración en volúmenes muy pequeños (μL) de forma continua.
 - b) Tiempos muy cortos (s) para efectuar los análisis cromatográficos.

A continuación se detalla el montaje diseñado para realizar los análisis de respiración:

CÁMARAS DE RESPIRACIÓN O RESPIRÓMETROS

Se implementaron 2 cámaras de respiración diferentes para utilizar de acuerdo al diseño experimental que se utilizara: una cámara de vidrio hermética con una capacidad de 7 L y otra de acero inoxidable hermética con una capacidad de 2,777 L.

La de vidrio se utilizó para analizar la respiración de varias frutas simultáneamente (Fig. V.2.4.a.) y la más pequeña para analizar la respiración de una sola fruta por ensayo (Fig. V.2.4.b.).

En ambas cámaras utilizadas se procuró que la estanqueidad fuera total.

La estanqueidad de la cámara de vidrio se consiguió humedeciendo con glicerol las superficies (tapa y cuerpo) para mejorar el contacto entre ambas y evitar cualquier fuga de gas durante los ensayos. En esta cámara, la toma de muestra se encuentra en la parte superior siendo conducida directamente al micro cromatógrafo (mCG) por un conducto de material plástico impermeable a los gases (Figura V.2.4.a.).

El respirómetro de acero inoxidable se diseñó con un cierre tórico que asegurara la estanqueidad del recinto durante todo el tiempo en el que se realizan los muestreos (Fito Suñer, 2002, Segura, 2001).

El sistema consta de una cámara cilíndrica realizada en acero inoxidable, de 160 mm de diámetro y 150 mm de alto. Posee una válvula para permitir realizar la medida de la concentración gaseosa en sistema cerrado o estático, a la que se le conecta un tubo de acero inoxidable que conducirá la muestra gaseosa a analizar al mCG. Dicha válvula se ubica en el punto medio de la cámara para asegurar que la muestra de gases tomada en cada instante sea homogénea (Fig. V.2.4.b.).

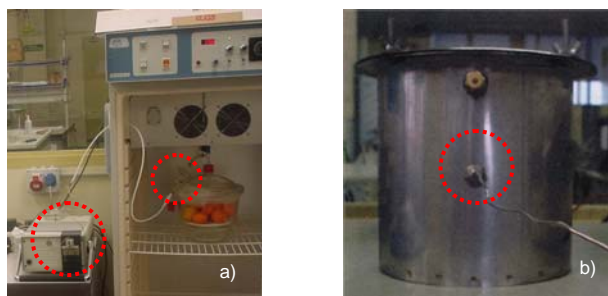


Fig. V.2.4. Cámaras de respiración o respirómetros. (a) Cristal, (b) Acero Inoxidable. Detalle de las tomas de muestras con sus conexiones directas al micro cromatógrafo de gases (mCG).

MICRO CROMATÓGRAFO DE GASES

Se utilizó un micro cromatógrafo de gases (mCG) HP M Series Micro Gas Chromatograph con detector del tipo Estado Sólido perteneciente a la familia

de detectores de Conductividad Térmica de muestreo automático por aspiración y sensibilidad 1 ppm (v/v).

Como gas portador o fase móvil de los compuestos a analizar se utilizó Helio.

El mCG utilizado posee dos módulos que contienen cada uno: un micro inyector, columnas (analítica y referencia), un horno, un micro detector del tipo de estado sólido y calentadores.

a) Módulo A: Las columnas utilizadas son del tipo MS5A (Molecular Sieve 5A PLOT) que separa entre otros, los gases oxígeno y nitrógeno por fuerzas de tipo mecánico (tamaño molecular y por configuración o estructura).

b) Módulo B: Las columnas utilizadas son del tipo OPM-PU08 – Pora PLOT U que separa los compuestos: anhídrido carbónico (CO₂) y metano (CH₄) entre otros, por procesos de adsorción (Valcárcel y Gómez, 1994).

La toma de muestra de la atmósfera la realiza el propio mCG automáticamente aspirando microlitros (μL) y realizando los análisis en aproximadamente 60 segundos, dependiendo de las condiciones del método que se aplique en cada caso. Esta característica permite realizar medidas casi en forma continua. El control del mCG y el análisis de los datos (concentración de cada uno de los gases detectados) se realizan con el programa HP EZChrom Chromatography Data System (HP M Series Micro Gas Chromatograph, User's Manual, 1998).

La operación de calibración del mCG se realizó una vez por semana utilizando como gases patrón, mezclas de nitrógeno con cada uno de los gases a analizar en concentraciones lo más parecidas y ajustadas posibles a lo que se buscaba medir de acuerdo al interés del trabajo. Así, se utilizaron patrones de O₂ (20,04%), CO₂ (0,99%), CH₃CHO (57 ppm) y C₂H₅OH (94 ppm).

Todas las mezclas utilizadas fueron preparadas y certificadas por la empresa Abello Linde S.A., Gases Técnicos, Barcelona.

V.2.4.2. Metodología de análisis

La cámara de respiración o respirómetro se conectó al micro cromatógrafo de gases (mCG), el cual analizaba, a intervalos de tiempo prefijados (cada 20 minutos), la composición de la atmósfera que rodea al fruto o espacio de cabeza.

Dicho intervalo fue elegido considerando el interés de la detección de cambios significativos de la tasa respiratoria en frutas almacenadas en distintas condiciones, tomando en consideración que el error experimental (ϵ) cometido fuera aceptable (Apartado V.3.).

Los cuatro compuestos gaseosos analizados fueron oxígeno, anhídrido carbónico, acetaldehído y etanol. El oxígeno y el anhídrido carbónico por ser el que se consume y se produce respectivamente en el proceso respiratorio (Wills *et al.*, 1998; Wills *et al.*, 1984).

El acetaldehído y el etanol por ser volátiles que si bien son constituyentes del aroma en cantidades ínfimas (desde 0,2 a 60 μg por kg y hora) (Norman, 1977) cuando se detecta su presencia en el espacio de cabeza la mayoría de las veces están indicando la presencia de fermentaciones en el fruto que se desencadenan generalmente por la ocurrencia de algún tipo de estrés en el tejido estudiado.

Se elaboraron dos métodos cromatográficos diferentes: uno para la detección del oxígeno y el anhídrido carbónico y otro para la detección del acetaldehído y etanol de muestras gaseosas del espacio de cabeza del fruto ubicado en la cámara de respiración.

Para ello fue necesario fijar una serie de parámetros del equipo, cuyas condiciones de trabajo para ambos métodos se resumen en la Tabla V.2.1.

Tabla V.2.1. Condiciones de trabajo del micro cromatógrafo de gases (mCG) para ambos métodos.

Compuestos analizados	Oxígeno (O ₂)	Anhídrido Carbónico (CO ₂)	Acetaldehído (CH ₃ CHO)	Etanol (C ₂ H ₅ OH)
Columna	A MS5A Molecular Sieve 5A PLOT	B OPM-PU08 Pora PLOT U	B OPM-PU08 Pora PLOT U	B OPM- PU08 Pora PLOT U
Temperatura (°C)	90	65	153	153
Presión (psi)	27,7	24,6	24,9	24,9
Tiempo de toma de muestras (<i>Sample Time</i>) (s)	20	20	20	20
Tiempo entre tomas de muestras (<i>Run Time</i>) (s)	90	90	115	115
Tiempo de inyección (<i>Inyect Time</i>) (ms)	20	50	150	150
Tiempo entre inyecciones (<i>Time Between Injections</i>) (s)	100	100	125	125
Sensibilidad	Baja	Media	Alta	Alta

A tales efectos, se aplicó un método a continuación del otro inmediatamente, a intervalos de 20 minutos, durante las 3 horas que la fruta permanecía dentro de la cámara de respiración con humedad relativa y temperatura controladas, a presión atmosférica.

Los compuestos detectados por el mCG son registrados en porcentaje volumétrico o en partes por millón volumétrico (ppm), según el método de calibrado utilizado. Los resultados fueron convertidos a fracciones molares.

CONTROL DE LA TEMPERATURA

A los efectos de mantener un control estable de la temperatura durante la toma de muestras de respiración de las frutas, la cámara de respiración se colocó dentro de una incubadora refrigerada de precisión (J. P. Selecta

HOTCOLD M 4000668, a una temperatura de 21°C, simulando condiciones comerciales (Figura V.2.5).



Fig. V.2.5. Detalle del mCG conectado (→) a la cámara de respiración ubicado dentro de la incubadora con control de temperatura (21 °C).

GENERACIÓN DE UNA HUMEDAD RELATIVA DETERMINADA DENTRO DE LA CÁMARA DE RESPIRACIÓN

Siendo el objetivo de esta Tesis Doctoral contribuir al desarrollo de métodos en el sector de la postcosecha de detección de estrés en fruta almacenada y teniendo en cuenta que la humedad relativa de uso común en almacenamiento de cítricos es de 90-95% (Arpaia y Kader, 2000), se consideró de interés comenzar este estudio en condiciones de 2 humedades relativas diferentes entre sí y a las de uso común (75,5 y 85%) de modo que los resultados obtenidos pudieran servir para componer parte de una matriz de determinados factores ambientales de almacenamiento y la correspondiente respuesta fisiológica detectada.

Para generar humedades relativas de 75,5 y 85% en el interior del respirómetro o cámara de respiración, se prepararon disoluciones saturadas de cloruro de sodio (NaCl) y de cloruro de potasio (KCl) respectivamente, contenidas en recipientes de cristal y ubicadas en la superficie inferior de la cámara de respiración (Fig. V.2.6.).

Para minimizar la disolución del CO₂ en la disolución salina, se acidificó la misma hasta pH = 2 con ácido clorhídrico (HCl) 10⁻³ M. Este pH es inferior al pKa₁ del ácido carbónico (6,46) lo que asegura la volatilización del ácido disuelto y su presión parcial en la cámara.



Fig. V.2.6. Respirómetro con disolución salina acidificada.

La a_w de las disoluciones fue controlada por medio de un higrómetro de punto de rocío Decagón modelo CX-3 (AQUA LAB), sensibilidad $\pm 0,001$ en el intervalo de temperaturas 20-27°C, previa comprobación de la calibración del mismo con soluciones patrones de las referidas disoluciones saturadas. Cada medida se realizó por triplicado.

V.2.5. PLAN EXPERIMENTAL

El plan experimental consistió en realizar:

1) Pruebas preliminares de aplicación del método propuesto en esta Tesis Doctoral con frutas cítricas de la variedad Navelate para ajuste del sistema de análisis y de los cálculos correspondientes.

2) A continuación se procedió a realizar ensayos con naranjas de la misma variedad para analizar los cambios fisiológicos que se producen en las mismas cuando son inoculadas artificialmente con esporas de los hongos *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer, almacenadas a determinadas condiciones ambientales (75,5 o 85% de humedad relativa (HR) y 21 °C).

Con el fin de explorar cómo evoluciona un mismo agente infeccioso en frutas de una misma variedad pero en estadios diferentes de maduración, se eligieron naranjas Navelate pertenecientes a dos lotes (Lote 1 y Lote 2) de características de madurez diferentes. Cada lote constó de 16 naranjas.

Antes de empezar cualquiera de los ensayos descritos (control de calidad de la materia prima; respiración y de inoculación), las frutas fueron almacenadas a 4°C. Luego, previo a toda manipulación, se equilibraron las mismas durante 24 horas a 21°C y humedad relativa correspondiente.

A los efectos de mantener constantes las variables ambientales (temperatura y humedad relativa) de las frutas (sanas e inoculadas) durante el almacenamiento, se las ubicó en desecadores de vidrio cerrados con orificio de ventilación abierto al ambiente en presencia de disoluciones saturadas de sales cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl), con control de HR por medio de un higrómetro de cabello (tipo reloj) y de T (21°C) con un termómetro (Fig. V.2.7.a y b).

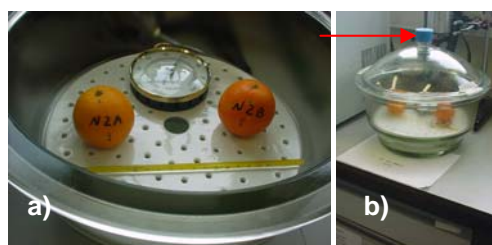


Fig. V.2.7. a) Detalle interno del desecador: Naranjas inoculadas almacenadas con control de HR y T. b) Detalle externo del desecador. Orificio de ventilación abierto (→).

Las naranjas pertenecientes a ambos lotes se inocularon con esporas de dos microorganismos diferentes: *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer. Se trabajó en duplicado, es decir aplicando el mismo tratamiento a 2 naranjas.

Se midió la respiración tanto a las frutas control (sin inocular) como a las frutas inoculadas estudiando en todos los casos la evolución de la respiración y la eventual detección de volátiles indeseables (acetaldehído y etanol) con respecto al tiempo de infección - 8 días a partir de la inoculación- y a la aparición de signos visuales de infección.

A tales efectos, y tras el atemperado, se registró el peso inicial y los diámetros correspondientes para calcular el volumen y superficie de la naranja a analizar y se ubicó la fruta a analizar en el respirómetro.

Se purgaron las columnas de análisis del cromatógrafo realizando 20 tomas de aire ambiente. Finalizada esta purga se conectó el mCG a la cámara de respiración por medio de un tubo de acero inoxidable de 0,1 cm de diámetro y 70 cm de largo ($V = 7\text{mL}$).

Una vez cerrada la cámara de forma hermética, se mantuvo durante 10 minutos para equilibrar la composición del espacio de cabeza.

A partir de este momento se comenzó a analizar los cambios ocurridos en el espacio de cabeza, tomando muestras del mismo cada 20 minutos durante un total de 3 horas. Finalizado el análisis se abrió la cámara de respiración, registrándose el peso final de la fruta y los diámetros, retornándose la naranja analizada a su lugar de almacenamiento correspondiente.

Las medidas de respiración se realizaron para las frutas control y para las frutas inoculadas a los días 0, 2, 3, 4, 7 y 8, cada 20 minutos durante 3 horas.

En la Fig. V.2.8. se puede observar un diagrama del plan experimental realizado.

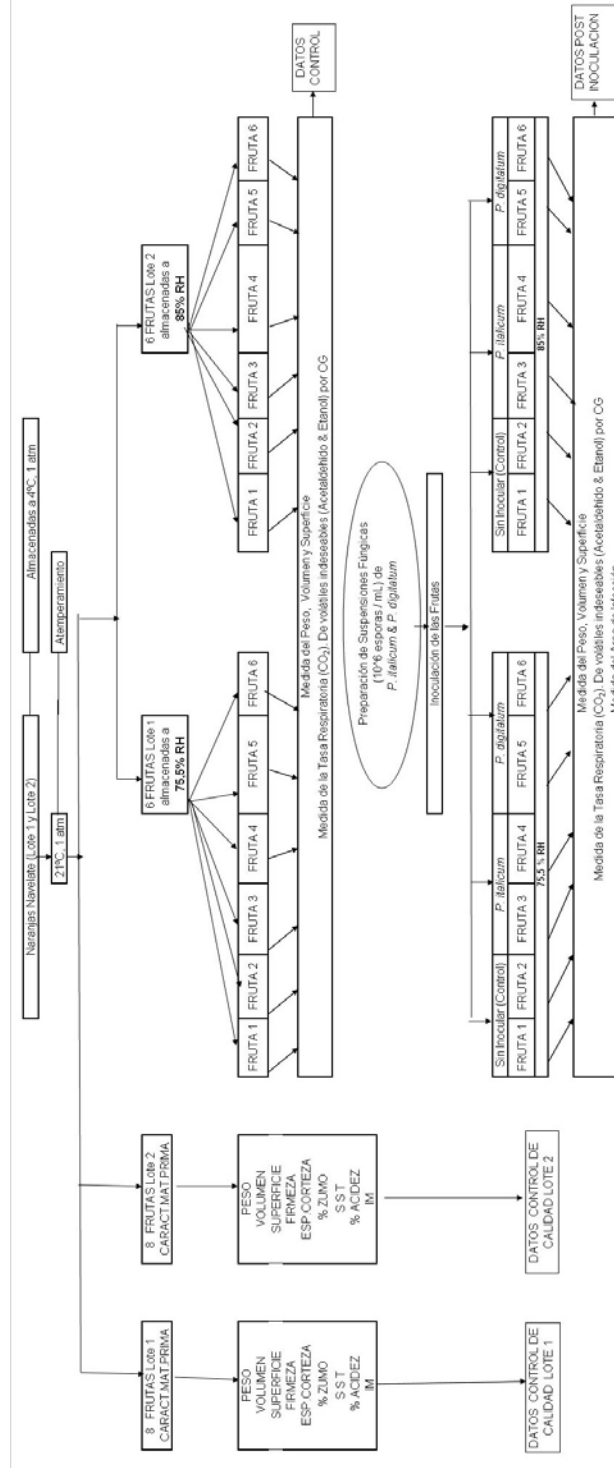


Fig. V.2.8. Secuencia de pasos realizados durante los ensayos.

V.2.6. CUANTIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN FÚNGICA

Paralelamente al análisis de cambios metabólicos en la fruta inoculada, esta fue observada con el objetivo de detectar visualmente signos de desarrollo de la infección fúngica en cada una de las zonas donde fueron puncionadas e inoculadas.

Se observó el proceso de evolución de las mismas, registrándose cambios en la textura y color y cambios por la aparición de micelio y esporas.

En cada una de estas zonas alteradas, se midió diariamente el radio de infección con pie de rey o calibre milimétrico de lectura digital (precisión de 0,01 mm), por triplicado.

Puesto que la zona de infección avanzó en la mayoría de los casos de manera homogénea por la superficie del fruto conformando casquetes casi perfectos sobre la naranja, éstos se calcularon revolucionando el arco de la zona de infección.

Para ello, se utilizó la resolución de la Integral de Riemann de un arco revolucionado (Ec. V.2.2.) (Harris y Stocker, 1998).

$$S_{rev.} = \pi(r^2 + h^2) \quad (V.2.2.)$$

Siendo:

h: altura del casquete

r: radio de la base del casquete

Para la aplicación de la ecuación anterior es necesario determinar la altura del casquete (h) en base a valores conocidos, tales como el radio de la base del casquete (r) y el radio medio de la naranja (R) (Fig.V.2.9).

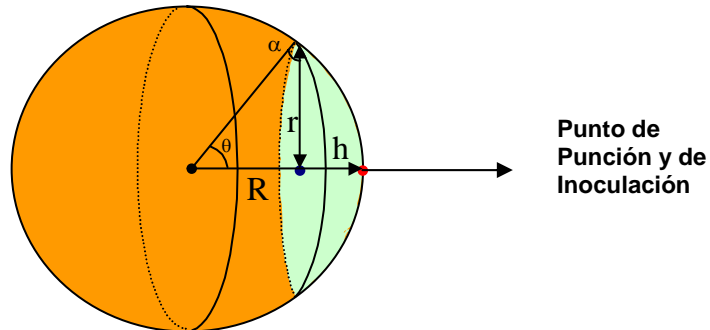


Fig. V.2.9. Diagrama del cálculo de la superficie de revolución mediante la ecuación de la Integral de Riemann.

Según la figura V.2.9., el valor de h queda relacionado con R según la Ec. V.2.3.:

$$h = R - R \operatorname{sen} \alpha \quad (\text{V.2.3.})$$

Por otra parte, la relación entre R y r viene definida por la Ec. V.2.4:

$$\frac{r}{\operatorname{sen} \theta} = \frac{R}{\operatorname{sen} \frac{\pi}{2}} \quad (\text{V.2.4.})$$

Obteniéndose θ como (Ec. V.2.5.):

$$\theta = \operatorname{Arcsen} \left(\frac{r}{R} \right) \quad (\text{V.2.5.})$$

El valor de α viene dado por la relación entre ángulos del triángulo (Ec. V.2.6.):

$$\alpha = \frac{\pi}{2} - \theta \quad (\text{V.2.6.})$$

Y por tanto (Ec. V.2.7.):

$$\operatorname{sen} \alpha = \operatorname{sen} \left(\frac{\pi}{2} - \theta \right) \quad (\text{V.2.7.})$$

Por sustitución de la Ec. V.2.7. en la Ec. V.2.3. y aplicando la Ec. V.2.5., puede determinarse el valor de h como una función de valores medibles, r y R (Ec. V.2.8.):

$$h = R(1 - \sin(\frac{\pi}{2} - \arcsen(\frac{r}{R}))) \quad (V.2.8.)$$

Consecuentemente, se registró diariamente el área de infección total (cm²) como la suma de las subáreas provenientes de los casquetes generados en cada punto de inoculación (4 por fruta).

V.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico Statgraphics® Plus en su versión 4.1 para *Windows* aplicando ecuaciones de regresión no lineal.

V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.3.1. DESARROLLO DE UN SISTEMA ANALÍTICO PARA LA MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN EN FRUTAS

Sobre la base de la revisión bibliográfica realizada acerca de los métodos de respiración y los distintos sistemas experimentales que existen para medir respiración en frutas (detallados en la Introducción General) y dado que el estudio de respiración se enfocó hacia los cítricos, frutas que en general tienen una tasa respiratoria baja, procurando además conseguir tiempos de experimentación cortos, se decidió la implantación a escala de laboratorio de un sistema de análisis de tipo estático o cerrado.

El mismo consiste en la cámara de respiración ubicada dentro de una cámara termostataada la cual se conecta a un micro cromatógrafo de gases (mCG) que tiene las siguientes características: toma automática de muestras de espacio del cabeza y tiempos cortos de análisis (minutos).

Las medidas se realizan con control de temperatura y con control de humedad relativa, que coinciden con las del almacenamiento de las frutas.

A intervalos de tiempo prefijados (10; 20; 30 minutos) se realizan tomas de muestras gaseosas del espacio de cabeza y se controla, mediante cromatografía gaseosa, la composición de la atmósfera que rodea a la fruta, durante unas 3 horas, asegurando que la concentración de O₂ esté siempre por encima del 18% que es cuando comenzarían las fermentaciones (Bower, 1998), lo que se denomina como punto de extinción (Wills, 1984). La toma de muestra de la atmósfera la realiza el micro cromatógrafo de gases (previamente calibrado) automáticamente por aspiración. Los resultados de los ensayos son analizados mediante el paquete informático HP EZChrom Chromatography Data System y son expresados como % o ppm de acuerdo al gas estándar de calibración utilizado en el método cromatográfico aplicado.

El utilizar una toma de muestras del espacio de cabeza de tipo automático constituye una innovación en el muestreo de gases respiratorios. En muchos estudios de respiración en frutas la toma de muestra implica un proceso laborioso y largo: las muestras se recogen con una jeringa del espacio de cabeza de recipientes que contienen las frutas para luego ser inyectadas en un cromatógrafo de gases (mCG) (Pesis y Marinansky, 1990; Velásquez *et al.*, 1998; Bhowmik y Hulbert, 1989; Park *et al.*, 1996, Eckert y Ratnayake, 1994), lo que aumenta el grado de manipulación de toda la operación, incrementando además el tiempo del análisis.

El sistema permite aspirar por la bomba que tiene el micro cromatógrafo de gases la muestra de manera prácticamente continua y durante el tiempo determinado por el experimento. Inmediatamente después la misma es analizada por el mCG en minutos, optimizando el tiempo total de los ensayos, constituyéndose ambas características en ventajas sobre la mayoría de los métodos habituales existentes.

En este caso al encerrar en un recipiente estanco la fruta a medir durante 3 horas se han simulado aproximadamente las condiciones comerciales en las que se almacenan las frutas que habitualmente son del tipo de sistema dinámico pero a bajas tasas de ventilación (Waks *et al.*, 1985).

Para la detección de los gases de interés de este trabajo se elaboraron 2 métodos cromatográficos diferentes (ver especificaciones técnicas en la Tabla V.2.1. del Apartado V.2.4.2.): un método para medir el oxígeno (O₂) y anhídrido carbónico (CO₂) y otro para medir volátiles indeseables, acetaldehído (CH₃CHO) y el etanol (C₂H₅OH) en el espacio de cabeza analizado.

V.3.1.1. DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS ÓPTIMOS DE ANÁLISIS

Para establecer las condiciones óptimas de análisis que aseguren la buena reproducibilidad y veracidad de los resultados obtenidos, se estimó, a partir de datos bibliográficos, el tiempo máximo entre renovaciones de aire de la cámara así como el intervalo de tiempo mínimo entre tomas de muestras consecutivas.

TIEMPO MÁXIMO ENTRE RENOVACIONES DE AIRE

La evolución del fruto hacia la senescencia, así como su índice respiratorio son procesos oxidativos, por lo que su dependencia de la presencia de oxígeno ambiental es completa. Así, la velocidad de respiración va descendiendo hasta valores mínimos a medida que la disponibilidad de oxígeno es muy baja. Además, está demostrado que elevadas concentraciones de CO₂ por encima de un valor umbral, en el caso de cítricos, valores superiores al 3-4% según Kader y Arpaia (2000), implican el comienzo de desórdenes fisiológicos importantes en la fruta similares a los que se producen en la anaerobiosis (Wills *et al.*, 1984) que lo llevan rápidamente a la senescencia.

Precisamente todos los sistemas de conservación en atmósferas modificadas o controladas se basan en la utilización de combinaciones extremas de estos dos gases que reduzcan al máximo la intensidad respiratoria así como todos los procesos metabólicos de naturaleza oxidativa, sin llegar a causar desórdenes fisiológicos en las mismas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente comentado y con el objetivo de poder obtener valores de respiración en condiciones normales, sin que la composición de la atmósfera sea un factor limitante en la velocidad, es necesario, por tanto, mantener dentro de la cámara unas concentraciones relativamente estables.

Para ello y puesto que el sistema permanecerá totalmente hermético con el tiempo y por tanto, con descensos en la concentración de oxígeno como consecuencia de la respiración, es necesario establecer un régimen de renovaciones completas del aire de la cámara a intervalos de tiempo prefijados.

Con el objetivo de poder obtener valores de respiración en condiciones normales sin intervenir en la velocidad respiratoria, se estableció un régimen de renovaciones completas del aire de la cámara a intervalos de tiempo fijados *a priori*, considerando como concentración límite el 18% de O₂. Tomando valores medios de tasas respiratorias de oxígeno (TR_{O₂}) de naranjas a distintas temperaturas encontrados en bibliografía (Arpaia y Kader, 2000) se determinó

la evolución de la fracción molar de O₂ (x_{O2}) con el tiempo a distintas condiciones (para un volumen de la cámara de 7 L), calculando así los tiempos (horas) para las renovaciones de aire (Tabla. V.3.1.).

Tabla V.3. 1. Tiempos (horas) estimados para las renovaciones de aire.

Temperatura	Numero de naranjas							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5°C	370	180	110	80	60	50	40	30
10°C	280	130	80	60	50	40	30	20
15°C	125	60	35	25	20	15	10	10
20°C	80	38	24	18	14	10	8	8

Como puede observarse, el volumen ocupado por los frutos juega un papel importante a la hora de realizar las renovaciones de aire, siendo esta dependencia de tipo exponencial.

INTERVALO DE TIEMPO ENTRE TOMA DE MUESTRA

El intervalo de tiempo entre las distintas tomas de muestra del espacio de cabeza queda determinado en función del error experimental (ε , en %) que se desee asumir, supeditado a la sensibilidad del micro cromatógrafo de gases (Ecuación V.3. 1).

$$\varepsilon(\%) = \frac{\text{sensibilidad ad análisis}}{\Delta x_i} \cdot 100 \quad (\text{V.3.1.})$$

Donde Δx_i representa la variación en la fracción molar del componente i en el intervalo de tiempo entre análisis. Con los valores medios de las tasas respiratorias (TR_{CO2}) citados por Arpaia y Kader (2000) para naranjas, se determinó la variación de la fracción molar (Δx_{CO2}) para las condiciones del ensayo y considerando la sensibilidad del micro cromatógrafo de gases (1 ppm), se estimó el error experimental cometido ε (%) para toma de muestras a distintos intervalos de tiempo. En la situación más difícil de observar cambios

(Tabla V.3.2.) que es el caso de una sola naranja a 5°C que normalmente tiene una tasa respiratoria (TR_{CO_2}) de 2-4 mL CO_2 /kg h, en un recipiente de 7 Litros de volumen, los intervalos de tiempo entre muestreos deberán ser superiores a 30 minutos considerando 2-2,5% un error aceptable.

Tabla V.3. 2. Error del análisis en porcentaje (ϵ) en ensayos con una sola naranja a 5°C.

Tiempo (Minutos)	x_{CO_2} (ppm)	ϵ (%)
0	0	
6	8×10^{-6}	12,5599
12	16×10^{-6}	6,2800
18	24×10^{-6}	4,1866
24	32×10^{-6}	3,1400
30	40×10^{-6}	2,5120
36	48×10^{-6}	2,0933
42	56×10^{-6}	1,7943
48	64×10^{-6}	1,5700
54	72×10^{-6}	1,3955
60	80×10^{-6}	1,2560

A 20°C, el error experimental (ϵ) en las condiciones del ensayo se estima en un 0,45% para intervalos de 30 minutos y en 0,90% para intervalos de 20 minutos.

V.3.2. FLUJOS GASEOSOS EN EL SISTEMA

En función de las condiciones atmosféricas (temperatura, HR), así como del estado fisiológico del producto a analizar, pueden definirse en el sistema los flujos de los distintos componentes gaseosos (N_i) a través de la interfase (Fig. V.3.1.) como los moles del componente i que se transfieren por unidad de tiempo y unidad de superficie de intercambio ($\text{mol}_i / \text{m}^2\text{h}$), como el oxígeno (O_2), el anhídrido carbónico (CO_2) y el agua en estado vapor (W). El resto de los componentes gaseosos del sistema como por ejemplo el acetaldehído, el etanol y otros volátiles aparecen en concentraciones bajas que se pueden considerar despreciables.

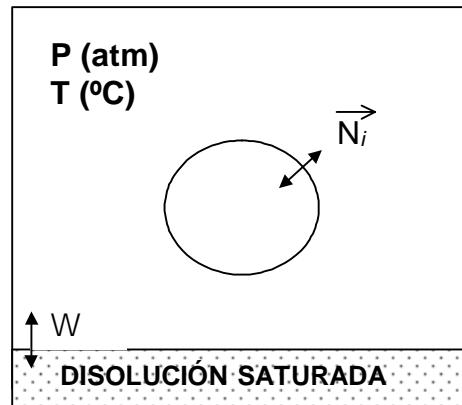


Fig. V.3.1. Esquema de la evolución del sistema.

Teniendo en cuenta que la fruta ha sido encerrada en la cámara a presión atmosférica durante un tiempo, si bien corto pero igualmente controlando (conociendo la especie, el cultivar, el grado de madurez y la temperatura) que no se alcance el punto de extinción, pues sino se iniciaría la vía anaerobia de la respiración produciéndose fermentaciones, puede plantearse el balance en términos de números de moles de cada uno de los componentes presentes en el volumen del reactor (fase gas) según la ecuación V.3.2.:

$$n_T = n_{\text{O}_2} + n_{\text{CO}_2} + n_{\text{N}_2} + n_{\text{H}_2\text{O}} \quad (\text{V.3.2.})$$

Y por tanto la variación con el tiempo en la fase gas (Ecuación V.3.3.):

$$\frac{\partial n_T}{\partial t} = \frac{\partial n_{O_2}}{\partial t} + \frac{\partial n_{CO_2}}{\partial t} + \frac{\partial n_{N_2}}{\partial t} + \frac{\partial n_{H_2O}}{\partial t} \quad (V.3.3.)$$

Si el volumen es constante y la humedad se mantiene también constante (Ecuaciones V.3.4 y V.3.5.):

$$\frac{\partial n_{N_2}}{\partial t} = 0 \quad n_{N_2} = \text{cte} \quad (V.3.4.)$$

$$\frac{\partial n_{H_2O}}{\partial t} = 0 \quad n_{H_2O} = \text{cte} \quad (V.3.5.)$$

Por tanto, la ecuación V.3.3. se transforma en la ecuación V.3.6.:

$$\frac{\partial n_T}{\partial t} = \frac{\partial n_{O_2}}{\partial t} + \frac{\partial n_{CO_2}}{\partial t} \quad (V.3.6.)$$

En presencia de suficiente oxígeno la reacción metabólica predominante será la respiración aerobia, donde la relación estequiométrica entre el O₂ consumido y el CO₂ desprendido será equimolecular, y por tanto la variación en el número de moles de O₂ será igual a la variación de moles de CO₂ en el sistema (Ecuación V.3.7.):

$$-\frac{\partial n_{O_2}}{\partial t} = \frac{\partial n_{CO_2}}{\partial t} \quad (V.3.7.)$$

y en ese caso (Ecuación V.3.8.):

$$\frac{\partial n_T}{\partial t} = 0 \quad (V.3.8.)$$

Por tanto, el número de moles totales será constante, lo que implica que a temperatura constante, la presión total el reactor permanecerá constante (Ecuación V.3.9.):

$$P = \frac{n \cdot R \cdot T}{V} = \text{cte} \quad (V.3.9.)$$

Así pues, las variaciones de presión total pueden expresarse como (Ecuación V.3.10.):

$$\frac{\partial P_T}{\partial t} = 0 = \frac{\partial p_{O_2}}{\partial t} + \frac{\partial p_{CO_2}}{\partial t} \quad (V.3.10.)$$

y por tanto (Ecuación V.3.11.):

$$-\frac{\partial p_{O_2}}{\partial t} = \frac{\partial p_{CO_2}}{\partial t} \quad (V.3.11.)$$

y esta relación se cumple con cualquier unidad molar de concentración, como fracciones molares.

Por tanto, de la Ecuación V.3.11. puede deducirse claramente la relación entre las fracciones molares (x_i) de los distintos componentes gaseosos de la atmósfera (Ecuación V.3.12.):

$$-\frac{\partial x_{O_2}}{\partial t} = \frac{\partial x_{CO_2}}{\partial t} \quad (V.3.12.)$$

Sin embargo, si la concentración de oxígeno que rodea al fruto desciende por debajo de un valor umbral o la concentración de anhídrido carbónico resulta excesiva, pueden comenzar a producirse procesos de respiración anaeróbicos, con el aumento en la concentración de otros componentes volátiles, tales como acetaldehído y etanol que serán también producidos aunque en forma líquida, volatilizándose una pequeña proporción que pasará a la atmósfera. En este caso, no será de aplicación la igualdad de la Ecuación V.3.12. por lo que será de importancia identificar y cuantificar las fracciones molares de todos los gases presentes en la atmósfera.

En cualquier caso, teniendo en cuenta la ley de los gases ideales, el número de moles del componente i (n_i) en un determinado momento (t_j) se puede relacionar con su fracción molar (x_i) según (Ecuación V.3.13.):

$$n_i^{t_j} = x_i \cdot \frac{P \cdot V_a}{R \cdot T} \quad (V.3.13.)$$

siendo:

$n_i^{t_j}$ = moles del componente i presentes en la atmósfera a tiempo t ($j = 0, 1, 2, \dots$)

x_i = Fracción molar del componente i (moles i / moles totales)

P = Presión absoluta en la cámara (atm)

V_a = Volumen de aire en la cámara (L)

R = Constante de los gases ideales (0,082 atm L / mol K)

T = Temperatura (K)

Por otra parte, teniendo en cuenta el flujo del componente i a través de la interfase (\vec{N}_i), la variación en el número de moles presentes en la atmósfera durante un intervalo de tiempo ($t_2 - t_1$) puede expresarse según la Ecuación V.3.14.

$$n_i^{t_2} = n_i^{t_1} + \left[\vec{N}_i \cdot (t_2 - t_1) \cdot S \right] \quad (\text{V.3.14.})$$

siendo S la superficie de intercambio (m^2).

Conociendo la variación de las fracciones molares (x_i) de cada uno de los componentes gaseosos presentes en la atmósfera en intervalos de tiempo prefijados (determinados por cromatografía gaseosa) e igualando las ecuaciones V.3.13. y V.3.14., se puede calcular, por tanto, el valor del flujo de gas en cada uno de estos intervalos (Ecuación V.3.15.).

$$\vec{N}_i \Big|_{t_1}^{t_2} = \left(x_i^{t_2} - x_i^{t_1} \right) \cdot \frac{P \cdot V_a}{(t_2 - t_1) \cdot S \cdot R \cdot T} \quad (\text{V.3.15.})$$

A pesar de que en los estudios sobre transferencia de materia es usual la terminología anteriormente expuesta, numerosos estudios sobre fisiología vegetal encontrados en bibliografía determinan los flujos de gases durante los procesos respiratorios como coeficientes de respiración (TR_i), expresados

como moles del componente i emitidos o absorbidos por el fruto por unidad masa del producto y de tiempo ($\text{mol}_i / \text{kg h}$).

En este sentido, la Ecuación V.3.15. sería igualmente aplicable con ligeras modificaciones (Ecuación V.3.16.):

$$\overline{\text{TR}}_i \Big|_{t_1}^{t_2} = (x_i^{t_2} - x_i^{t_1}) \cdot \frac{P \cdot V_a}{(t_2 - t_1) \cdot M \cdot R \cdot T} \quad (\text{Ec. V.3.16.})$$

Donde M representa la masa del fruto (kg).

V.3.3. EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE ANÁLISIS DE LA TASA RESPIRATORIA

Dado que inicialmente resultaba de interés aplicar la metodología propuesta en esta Tesis Doctoral para estudiar la respiración de una sola fruta por ensayo, los experimentos preliminares se realizaron utilizando el sistema descrito con el respirómetro de acero inoxidable de 2,777 L de volumen, que brindaría un mejor ajuste de la detección de los gases respiratorios en el espacio de cabeza resultante con naranjas de la variedad Navelate y a 21°C durante 3 horas por ensayo. Se escogió dicha temperatura por ser la temperatura a la que se encuentra habitualmente la fruta en los locales comerciales para su venta, siendo al mismo tiempo una temperatura idónea para detectar cambios metabólicos.

Se calculó para este caso el tiempo máximo entre renovaciones de aire para evitar fermentaciones según lo explicado en el apartado V.3.1.1., resultando el mismo de 30 horas.

Para calcular el error experimental (ε) de los ensayos se tomó en primera instancia como referencia los valores de las tasas respiratorias (TR_{CO_2}) citados por Arpaia y Kader (2000) para naranjas a 20°C que fluctúan entre los 11 y 17 mL CO_2 /kg h. Dado que la ley de los gases ideales permite relacionar el número de moles de un componente en un determinado momento con su fracción molar, utilizando dicha expresión y según Bower *et al.* (1998); Schotsmans *et al.* (2003), se calcularon las tasas respiratorias (TR_{CO_2}) en moles CO_2 / kg h. Seguidamente se calculó la variación de su fracción molar a distintos tiempos con la Ec. V.3.16., teniendo en cuenta la sensibilidad del micro cromatógrafo, resultando el error experimental de 0,17% para intervalos de 30 minutos y 0,35% para intervalos de 20 minutos. Dado que uno de los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral es desarrollar un método analítico con toma de muestra continua y tiempos de análisis cortos y representativos de la respiración de la fruta, estimando como aceptable un 0,35% de error experimental, se optó por extraer muestras del espacio de cabeza cada 20 minutos.

Se enumeran a continuación las distintas etapas del proceso de cálculo de la tasa respiratoria de una fruta a la cual se le midió su respiración con la metodología propuesta:

- a) Toma de muestra del espacio de cabeza con la consecuente obtención de los datos correspondientes (en %) de los compuestos volátiles oxígeno (O_2) y anhídrido carbónico (CO_2) detectados con el método cromatográfico utilizado con el micro cromatógrafo de gases (mCG).
- b) Con los datos obtenidos ($\%CO_2$ y $\%O_2$) en el espacio de cabeza medidos cada 20 minutos y según lo explicado en el apartado V.3.2., es necesario:
1º) La transformación de los mismos a su fracción molar (x_i), 2º) Graficar la evolución de la fracción molar con el tiempo del ensayo (minutos). Con la pendiente de la recta y resto de variables utilizadas se calcula la tasa respiratoria (TR_{CO_2}) (moles CO_2 /kg h) (Ec. V.3.16.).

A modo de ejemplo, la evolución de las fracciones molares de oxígeno (x_{O_2}) y anhídrido carbónico (x_{CO_2}) respectivamente con respecto al tiempo del ensayo (minutos) correspondiente a una naranja variedad Navelate a la que se midió su respiración cada 20 minutos durante 3 horas a 21°C de temperatura y 75,5% HR dicha se representa en la Fig. V.3.2.

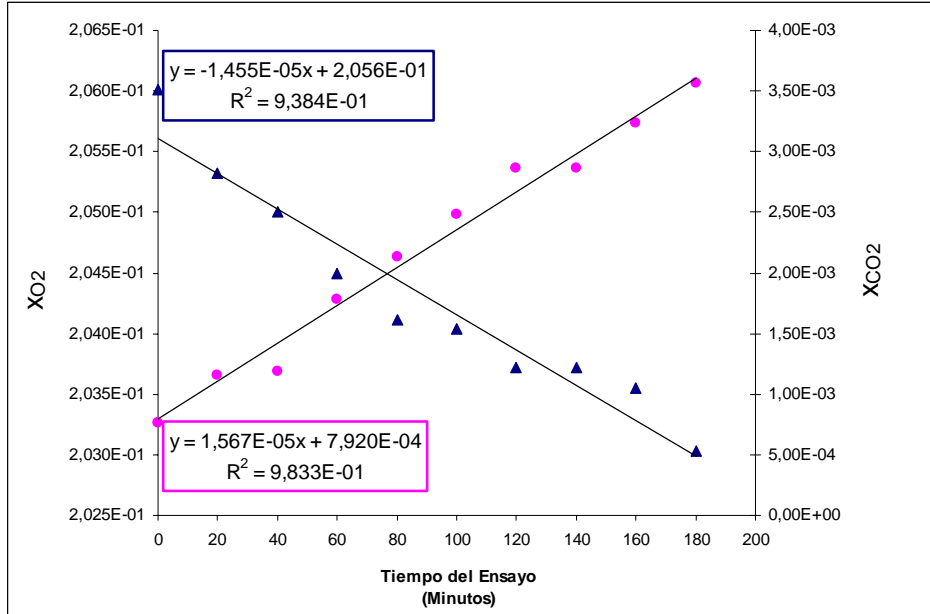


Fig. V.3.2. Evolución de la fracción molar de oxígeno (x_{O_2}) (▲) y de anhídrido carbónico (x_{CO_2}) (●) en el espacio de cabeza de una naranja variedad Navelate a 21°C y 75,5% HR.

Teniendo en cuenta las constantes y variables del sistema de trabajo se procede al cálculo de las tasas respiratorias, utilizando el valor de la pendiente extraído de la gráfica de cada volátil analizado.

En el caso de la naranja Navelate seleccionada como ejemplo, el valor obtenido de las tasas respiratorias, expresadas como consumo de O_2 (TR_{O_2}) y como producción de CO_2 (TR_{CO_2}), se presentan en la Tabla V.3.3., así como también su Cociente Respiratorio (CR) calculado (TR_{CO_2} / TR_{O_2}).

Tabla V.3.3. Tasas respiratorias (mol/ kgh y mL/ kgh) y CR para la naranja Navelate analizada.

Gas <i>i</i>	α (moles <i>i</i> / moles totales . min)	CR	TR (moles <i>i</i> / kg h)	CR	TR (mL <i>i</i> / kg h)	CR
CO_2	1,567E-05	1,07	7,66E-04	1,07	18,463	1,07
O_2	-1,455E-05		-7,13E-04		-17,192	

El valor del cociente respiratorio (CR) calculado resultó en 1,07, revelando al ser su valor prácticamente la unidad, que la glucosa era el sustrato respiratorio utilizado.

Según datos de Kader y Arpaia (2000), las naranjas sanas tienen una tasa respiratoria (TR_{CO_2}) (expresada como producción del volátil CO_2 por unidad de masa (kg) y tiempo (h)) que fluctúa entre 11–17 mL / kg h a 20°C. Aplicando la ecuación general de los gases ideales (Bower *et al.*, 1998; Schotsmans *et al.*, 2003) se pueden expresar la misma como de $5 - 7 \times 10^{-4}$ moles CO_2 /kg h a 20°C.

Teniendo en cuenta estas consideraciones y los resultados obtenidos, se puede derivar que mediante la metodología planteada ha sido posible determinar la tasa respiratoria (TR_{CO_2}) de la naranja seleccionada cuyo valor se encuentra dentro del rango de valores habituales para naranjas almacenadas a 20°C.

Como paso siguiente se estudió con esta metodología la evolución de la respiración de las naranjas frente al tiempo de almacenamiento y en las mismas condiciones experimentales.

Para ello se analizó en primera instancia la respiración de la misma naranja durante 8 días sucesivos, 3 horas cada día. Con el valor de la variación de la fracción molar de anhídrido carbónico (x_{CO_2}) versus el tiempo del ensayo (minutos), se calculó la tasa respiratoria para cada uno de los 8 días analizados (Fig. V.3.3.).

Como puede observarse, la tasa respiratoria permanece constante con el tiempo, con un valor medio de $0,711 \pm 0,012$ mmol CO_2 / kg h, valor que se encuentra dentro del rango de valores característicos de naranjas sanas almacenadas a 20°C según Arpaia y Kader (2000).

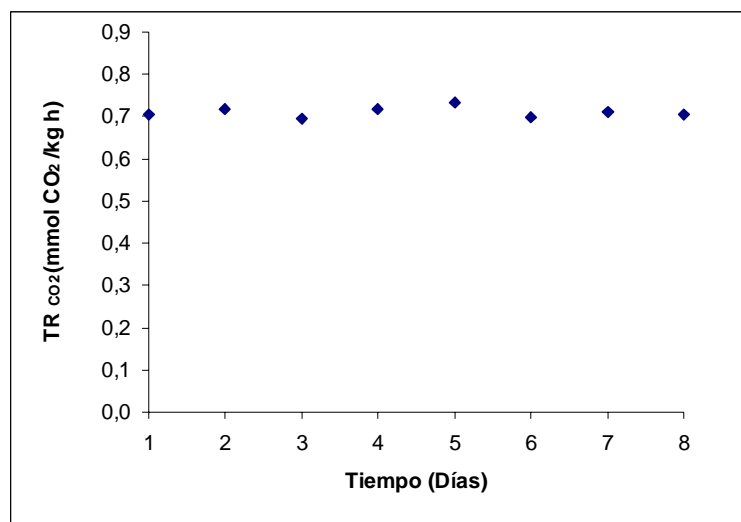


Fig. V.3.3 Evolución de la tasa respiratoria (TR_{CO2}) de una naranja var. Navelate durante 8 días a 21°C y 75,5%HR.

Seguidamente, se realizó el mismo ensayo con otras 10 naranjas de dos lotes diferentes de la misma fecha de colecta (Febrero 2002) (4 del lote A y 6 del lote B) de la misma variedad. A cada una se le midió su respiración 3 horas cada día durante 8 días.

Los resultados se observan de manera gráfica en la Fig. V.3.4., en donde se representa la evolución de las tasas respiratorias medias de las 10 naranjas Navelate analizadas durante los 8 días de almacenamiento.

Se observa que el valor medio de la tasa respiratoria (TR_{CO2}) de las 10 naranjas analizadas para cada uno de los 8 días permanece prácticamente constante, siendo su magnitud de $0,59 \pm 0,12$ mmol CO₂/kg h, el cual se halla dentro del rango de valores encontrados en bibliografía (Arpaia y Kader, 2000) de naranjas a 20°C.

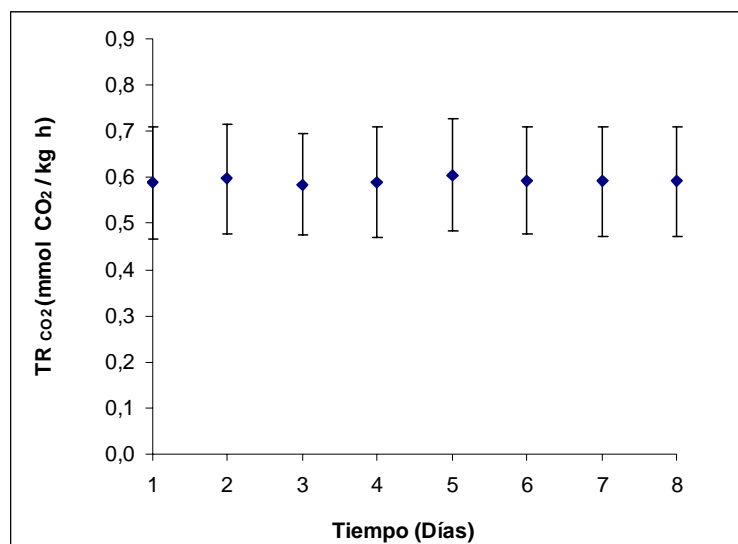


Fig. V.3.4. Evolución de la tasa respiratoria media (TR_{CO_2}) (mmol CO_2 /kg h) de 10 naranjas Navelate de 2 lotes diferentes a 21°C y 75,5% HR.

Se debe tener en cuenta que los valores citados por estos autores son cifras de tasas respiratorias medias para naranjas sanas almacenadas en condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa, para un índice de madurez de 8 o superior, los cuales pueden cambiar ligeramente dependiendo de la variedad de que se trate, la zona de producción y el estado de madurez de las frutas en el momento de la recolección.

Por lo tanto, a los efectos de completar el estudio de la fruta empleada en los ensayos de respiración, se determinaron sus características como materia prima (Tabla V.3.4.)

Estas características se encuentran dentro del entorno de valores típicos de naranjas de la variedad Navelate citados por Primo-Yúfera, (1997).

Como puede observarse, no existen diferencias significativas entre los dos lotes de materia prima, y de ahí la similitud entre los valores obtenidos en las tasas respiratorias. Además, los índices de madurez se encuentran en los

mismos rangos en los que otros autores (Arpaia y Kader, 2000) han evaluado tasas respiratorias, obteniendo valores similares.

Tabla V.3.4. Características de la materia prima utilizada en los ensayos de la medida de la respiración.

Parámetro	Lote A (Febrero 2002)	Lote B (Febrero 2002)
Peso medio por fruto (g)	139 ± 9	137 ± 10
Volumen medio por fruto (mL)	139 ± 7	139 ± 8
Firmeza media de pulpa por fruto (kg)	9,23 ± 1,11	9,403 ± 1,013
Espesor medio corteza (mm)	4,9 ± 0,3	4,8 ± 0,3
Contenido en zumo (%)	49	48,50
Fracción de sólidos solubles (%)	10,5	10
Acidez total (g. Ac. Cítrico Anhidro/100 mL de zumo)	1,17 ± 0,05	1,15 ± 0,04
Índice de Madurez (IM)	8,97	8,69

Las naranjas son frutos no climatéricos y por tanto al conseguir el grado de madurez apropiado en el árbol no registran cambios dramáticos en su tasa respiratoria después de la cosecha (Cuquerella, 1999). Su tasa respiratoria es reducida y constante dependiendo mayormente de la temperatura de almacenamiento (Schiffmann-Nadel, 1977).

Como en este caso se analizaron naranjas recién colectadas a la temperatura constante de 21°C, de ahí que su tasa respiratoria ha resultado prácticamente constante y dentro de los valores de referencia para dicha temperatura.

Numerosos estudios constatan este hecho. Pesis y Marinansky (1991) midieron la tasa respiratoria de naranjas de la variedad Shamouti a 22°C, colectadas a mitad de campaña durante 7 días, obteniendo una $TR_{CO_2} = 0,6$ mmol/kg h), la cual se mantuvo constante durante dicho lapso de tiempo.

Schiffmann-Nadel (1977) obtuvo resultados similares con Clementinas (que tienen por lo general una corta vida postcosecha) cosechadas en diferentes momentos de la campaña, a las cuales se les midió su respiración y se calculó su tasa respiratoria a 17°C, la cual en términos generales se mantuvo constante durante el tiempo de almacenamiento para cada colecta (20 días luego de su cosecha), fluctuando desde valores bajos, 0,56 mmol CO₂ /kg h, para el mes de octubre y llegando a 0,68 mmolCO₂ /kg h en el mes de diciembre.

Zauberman y Barkai-Golan (1975) midieron la respiración de naranjas de la variedad Valencia a 23°C, manteniéndose la misma constante y en un valor menor a los valores antes mencionados durante 10 días (0,32 mmoles CO₂/kgh).

En todos los estudios anteriormente citados, así como en los análisis efectuados en este estudio, no se detectaron volátiles indeseables (acetaldehído y etanol) en el espacio de cabeza de las naranjas analizadas.

Esto podría indicar que la respiración de las frutas se produjo mayormente por el metabolismo aerobio y que existía una condición sana del tejido frutal, no originándose fermentaciones etílicas que pudieran hacer que apareciera acetaldehído y etanol en el espacio de cabeza.

Los resultados obtenidos del estudio de las tasas respiratorias de naranjas Navelate sanas medidas a 21°C de características indicadas en la Tabla V.3.4., permiten concluir que se ha conseguido ajustar la metodología propuesta en esta Tesis Doctoral de toma automática de muestra por aspiración del espacio de cabeza con el mCG, puesto que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de valores de referencia encontrados en bibliografía.

Como siguiente paso, se procedió a aplicar dicha metodología en el estudio de los cambios fisiológicos que se pudieran producir en naranjas Navelate inoculadas artificialmente con esporas de los hongos *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer, almacenadas en determinadas condiciones.

Para ello, se realizaron ensayos de caracterización de la materia prima a inocular; ensayos de cultivo de los hongos utilizados; ensayos de inoculación de las frutas y medición de la respiración de las frutas inoculadas durante 8 días tras la inoculación artificial.

V.3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA DE LAS FRUTAS A INOCULAR

Se consideró de interés estudiar la influencia del ataque fúngico en la tasa respiratoria y en la producción de volátiles indeseables (acetaldehído y etanol) en frutas cítricas pertenecientes a una variedad (Navelate) con características diferentes y en distintos estados de maduración a los efectos de conocer distintas respuestas fisiológicas de frutas que pertenecen a una misma variedad frente a un mismo factor de estrés.

En este caso el factor de estrés es el ataque fúngico causado por los mohos *Penicillium* (específicamente *P. digitatum* Saccardo y *P. italicum* Wehmer) que habitualmente en los países productores y exportadores de cítricos en fresco, como por ejemplo España y Uruguay, constituye uno de los que más daño inflige a los cítricos en la postcosecha.

Los resultados obtenidos con estos ensayos podrán aportar cierta orientación para futuras investigaciones, con vistas a la detección precoz de la infección fúngica y en consecuencia contribuir a la prevención de la propagación de la infección fúngica causada por *Penicillium* en fruta almacenada.

Las frutas analizadas pertenecieron a dos lotes marcadamente diferentes de la variedad Navelate (el lote 1 recién cosechado en el mes de Febrero y el lote 2 cosechado en el mes de Mayo) procedentes de una cooperativa local.

Los ensayos de caracterización de la materia prima pertenecientes a los lotes 1 y 2 a los que luego se les realizaron los ensayos de determinación de la tasa respiratoria y aparición de volátiles indeseables (acetaldehído y etanol) dieron como resultado los que se presentan en la Tabla V.3.5.

Tabla V.3.5. Características de la materia prima utilizada en los ensayos de respiración e inoculación.

Parámetros	Lote 1 (Febrero 2002)	Lote 2 (Mayo 2002)
Peso medio por fruto (g)	136,1 ± 10,4	316 ± 26
Volumen medio por fruto (mL)	140 ± 9	345 ± 38
Firmeza de pulpa media por fruto (kg)	9,403 ± 1,013	8,7 ± 1,1
Espesor medio corteza (mm)	4,8 ± 0,3	6,5 ± 0,8
Contenido en zumo (%)	48,50	42,18
Fracción sólidos solubles (%)	10	11,23 ± 0,06
Acidez Total (g. Ac. Cítrico Anhidro/100 mL de zumo)	1,15 ± 0,04	0,523 ± 0,013
Índice de Madurez (IM)	8,7	21,405

Las naranjas pertenecientes al lote 2, cosechadas en el mes de mayo del mismo año que el lote 1, presentaron valores distintos en todas las características estudiadas, indicando un estadio de maduración diferente.

El incremento en el valor del peso y volumen respecto a las frutas del Lote 1 indican que se trata de un calibre mayor de la misma variedad.

Los valores menores de firmeza y acidez así como los valores mayores del espesor medio de la corteza, contenido en sólidos solubles y del IM, indican un estado de maduración mayor de las frutas, puesto que en la maduración de las naranjas, pomelos y mandarinas, hay un aumento en la concentración de sólidos solubles, sobre todo de los azúcares y un descenso importante de la acidez (Primo-Yúfera, 1997).

Todo esto, sumado a la variabilidad que conlleva esta clase de materia prima, podría ser la causa de las diferencias encontradas en las características analizadas que serán expuestas posteriormente, entre los 2 lotes pertenecientes a una misma variedad.

V.3.5. CULTIVOS DE LAS CEPAS DE LOS MOHOS UTILIZADOS

Según las características detalladas en los apartados V.1.2.1. y V.1.2.2., donde se expresa que en la superficie de la lesión se desarrolla una tenue vegetación fungosa con aspecto de fieltro, al principio de color blanco (micelio) pero que rápidamente cambia a una coloración que varía del color verde-amarillo al verde oliváceo para el *Penicillium digitatum* y del verde-azulado al verde-grisáceo para el *Penicillium italicum*, formada por las estructuras esporígenas que generan los conidios (esporas) y teniendo en cuenta que la fuente principal de contaminación son los conidios (Tusset, 1987), se realizó una observación de las características del crecimiento (velocidad y presencia de esporas o conidios) observado en los diferentes medios y modalidades experimentados en el cultivo de los mohos.

De los liófilos de *Penicillium digitatum* Saccardo y *Penicillium italicum* Wehmer obtenidos del CETC, reconstituidos y cultivados en laboratorio bajo las condiciones detalladas en el Apartado V.2.1., se obtuvieron los resultados detallados en la Tabla V.3.6., observados al 7º día, de acuerdo a lo indicado en dicho protocolo (V.2.1.2. de Materiales y Métodos).

Se concluyó que los cultivos realizados en Patata Dextrosa Agar (PDA) en placa y tubo inclinado resultaron ser los más adecuados, por presentar una buena velocidad de crecimiento con presencia de esporas para ambos mohos (Fig. V.3.5. y Fig. V.3.6.).

Tabla V.3.6. Resumen de las características observadas visualmente de los mohos cultivados en los medios Patata Dextrosa Agar pobre (PDA_p); Maltosa Agar pobre (MA_p); Maltosa Agar (MA); Patata Dextrosa Agar (PDA); Agua de Peptona y distintas modalidades.

	MEDIO	PDA _p	MA _p	MA	PDA	PDA	Agua de Peptona
Moho	<u>Modalidad</u>	<u>Tubo Inclinado</u>	<u>Tubo Inclinado</u>	<u>Placa</u>	<u>Placa</u>	<u>Tubo Inclinado</u>	<u>Tubo Vidrio Vertical</u>
<i>Penicillium digitatum</i> Saccardo Cepa CECT 2954	<u>Crecimiento</u>	Discreto	Mayor que en PDA _p	Discreto	Abundante	Abundante	No hay crecimiento
	<u>Coloración</u>	Blanca	Blanca	Blanquecina	Verdosa y blanca	Verdosa y blanca	
<i>Penicillium italicum</i> Wehmer Cepa CECT 2294	<u>Crecimiento</u>	Discreto	Más abundante	Muy abundante	Abundante	Abundante	Discreto pero taponando el tubo
	<u>Coloración</u>	Verdosa con abundante color blanco	Verdosa con puntos blancos	Verde y blanca (muchos puntos blancos)	Verde azulada intensa	Verde azulada intensa	Verdosa y blanca

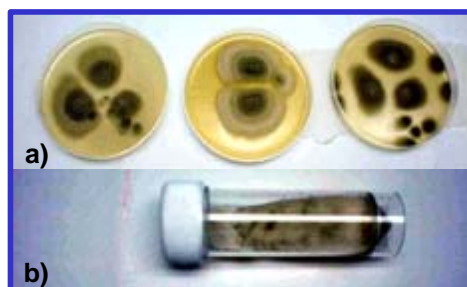


Fig. V.3.5. Cultivos obtenidos a partir del liófilo puro reconstituido de la cepa (CECT 2954) de *P. digitatum* Saccardo en PDA. a) En placa. b) En tubo.

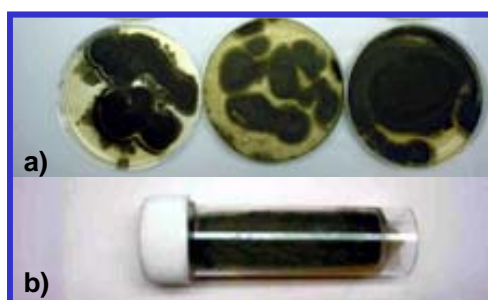


Fig. V.3.6. Cultivos obtenidos a partir del liófilo puro reconstituido de la cepa (CECT 2294) de *P. italicum* Wehmer en PDA. a) En placa. b) En tubo.

Se realizaron recuentos de las diferentes suspensiones de esporas para cada uno de los dos mohos por triplicado, con un hemocitómetro (Fig. V.3.7.). En estas imágenes se puede observar la diferencia de forma y de tamaño de las esporas entre ambas especies siendo las esporas de *P. italicum* Wehmer (Fig. V.3.7.a.) ($4 - 6\mu\text{m} \times 2,5 - 4\mu\text{m}$) más pequeñas en tamaño y de forma más redondeadas que las de *P. digitatum* Saccardo (Fig. V.3.7.b.) ($5,8 - 7,6\mu\text{m} \times 4,1 - 6,2\mu\text{m}$) de formas más cilíndricas.

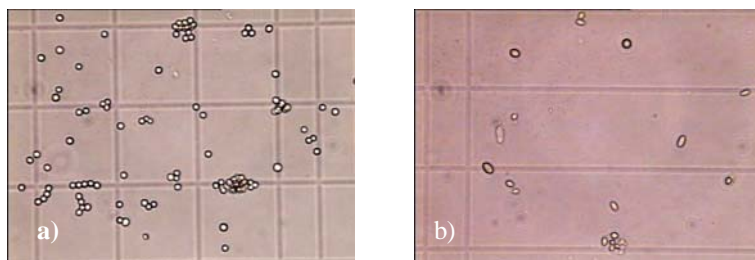


Fig. V.3.7. Hemocitómetro con esporas de *P. italicum* Wehmer (a) y *P. digitatum* Saccardo (b).

Sobre la base de los resultados obtenidos de los cultivos de los mohos, los ensayos de inoculación que se realizaron a las naranjas para estudiar su respiración frente a la infección fúngica se efectuaron con suspensiones de esporas provenientes de cultivos realizados en tubos inclinados con Patata Dextrosa Agar (PDA), por ser esta opción la de más fácil manipulación.

V.3.6. COMPORTAMIENTO DE LAS FRUTAS INOCULADAS

La metodología planteada en apartados anteriores (toma automática a tiempos cortos de muestra de gases del espacio de cabeza de fruta fresca para el estudio de su respiración) se aplicó al estudio de su posible utilidad en la detección de eventuales cambios metabólicos que se pudieran producir en frutas cítricas (naranjas, var. Navelate) frente a situaciones de estrés, como es por ejemplo, la de una infección fúngica.

Para ello se diseñaron experimentos que tuvieran en cuenta la diferencia en el índice de madurez (IM) entre los 2 lotes analizados (8,7 para el lote 1 y 21,4 para el lote 2) con el fin de observar si los cambios metabólicos que se pudieran detectar en las frutas inoculadas a consecuencia de la infección pudieran ser significativos.

Los ensayos consistieron en inocular 4 naranjas de cada lote (2 con esporas de *P. italicum* y 2 con esporas de *P. digitatum*) (de acuerdo al protocolo detallado en el Apartado V.2.3.), manteniendo 2 naranjas por lote como control negativo (sin inocular) y almacenadas en recipientes de cristal con orificio de aireación, a las mismas condiciones que las frutas inoculadas. Cada tratamiento (2 naranjas en cada uno) se almacenó por separado generándose un total de 6 recipientes.

Previo y posterior a la inoculación, las 12 naranjas (6 por lote) se almacenaron a una temperatura de 21°C y a una humedad relativa (HR) de 75,5% para el lote 1 y del 85% para el lote 2 durante 8 días.

Teniendo en cuenta, por un lado, que la germinación de las esporas de *Penicillium* sp. puede llevar algunos días en cítricos almacenados a los cuales luego les causarán el podrido (contaminación latente) (Tuset, 1987) y por otro, extrapolando datos de cultivos aislados a 25°C y 7 días en que se lograba un desarrollo aceptable de las estructuras fúngicas (micelio blanco e intensa conidiogénesis o esporulación coloreada de azul verdoso para *P. italicum* y verde oliva para *P. digitatum*), cultivados en los medios Czapek Autolisado de Levadura en Agar (CYA) y Extracto de Agar Malta (MEA) entre otros (Pitt,

1979), se escogió el período de tiempo total de muestreo de 8 días a partir de la inoculación artificial.

Este intervalo se consideró que podría resultar adecuado como para detectar de una manera ajustada la aparición de cambios metabólicos que se pudieran traducir en cambios en la composición del espacio de cabeza.

Sobre la base de estas consideraciones, se tomaron muestras del espacio de cabeza a tiempo cero (t_0), es decir, previo a la inoculación y a los 2, 3, 4, 7 y 8 DPI (días post inoculación) para estudiar la evolución del proceso infeccioso en cada uno de los 6 tratamientos desde los aspectos:

- Tasas respiratorias en términos de producción de CO_2 (TR_{CO_2}) y detección de volátiles indeseables (CH_3CHO y $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) en el espacio de cabeza.
- Desarrollo y evolución de los signos visuales de infección en la superficie de las frutas inoculadas.

V.3.6.1. FLUJOS RESPIRATORIOS COMO CONSECUENCIA DE LA INFECCIÓN

El objetivo del análisis de los resultados obtenidos consistió en la evaluación de la actividad respiratoria de las naranjas inoculadas artificialmente con esporas de *Penicillium* y su relación con el crecimiento microbiano en superficie.

A tales efectos se describirá y acotará en primer lugar el sistema propuesto.

DESCRIPCIÓN Y ACOTACIÓN DEL SISTEMA

El sistema naranja-entorno es muy complejo debido por un lado a su actividad metabólica interna y por otro a las barreras físicas -tejidos celulares- que deben atravesar estos flujos y a la composición atmosférica que la rodea, pudiendo todos estos factores influir sobre las distintas rutas metabólicas actuantes en la fruta.

En la Fig. V.3.8. se presenta un esquema del sistema estudiado: se ha ubicado a la naranja dentro del respirómetro durante 3 horas bajo condiciones de temperatura (21°C) y presión (1 atmósfera) conocidas y en presencia de disoluciones salinas acidificadas de a_w menores (0,75 y 0,85) a la a_w de la piel de la naranja (0,97) (Cháfer, 2000).

Se han aspirado muestras del espacio de cabeza y analizado cada 20 minutos con el micro cromatógrafo de gases (mCG), previo a la inoculación artificial y luego durante 8 días postinoculación con esporas de *Penicillium digitatum* o *Penicillium italicum* dependiendo del tratamiento aplicado.

En el esquema está representado de manera simplificada el intercambio gaseoso entre el interior del fruto y el exterior a través de la interfase (piel de la naranja), definiéndose como flujos gaseosos posibles el de los compuestos anhídrido carbónico (CO₂), oxígeno (O₂), agua (H₂O), acetaldehído (CH₃CHO), etanol (C₂H₅OH) y otros, como el etileno (C₂H₄) por ejemplo, los cuales circulan mayoritariamente por las vías apoplásticas, saliendo y entrando por los estomas, excepto el agua que sale mayoritariamente por superficie, es decir, por secado superficial.

En la Fig. V.3.8. se ha representado el interior del fruto, cuya composición celular se considera, a los efectos del modelo, constituida por una fracción insoluble (FI) y por una fracción líquida (FL) cuyo peso molecular estará determinado por la suma de los pesos moleculares de sus componentes: agua, azúcares de 6 carbonos (fundamentalmente glucosa y fructosa), acetaldehído y etanol.

Para simplificar el sistema propuesto, los flujos de gas se denominan flujos de difusión. En el caso del agua, sus flujos se encontrarán equilibrados con la disolución salina.

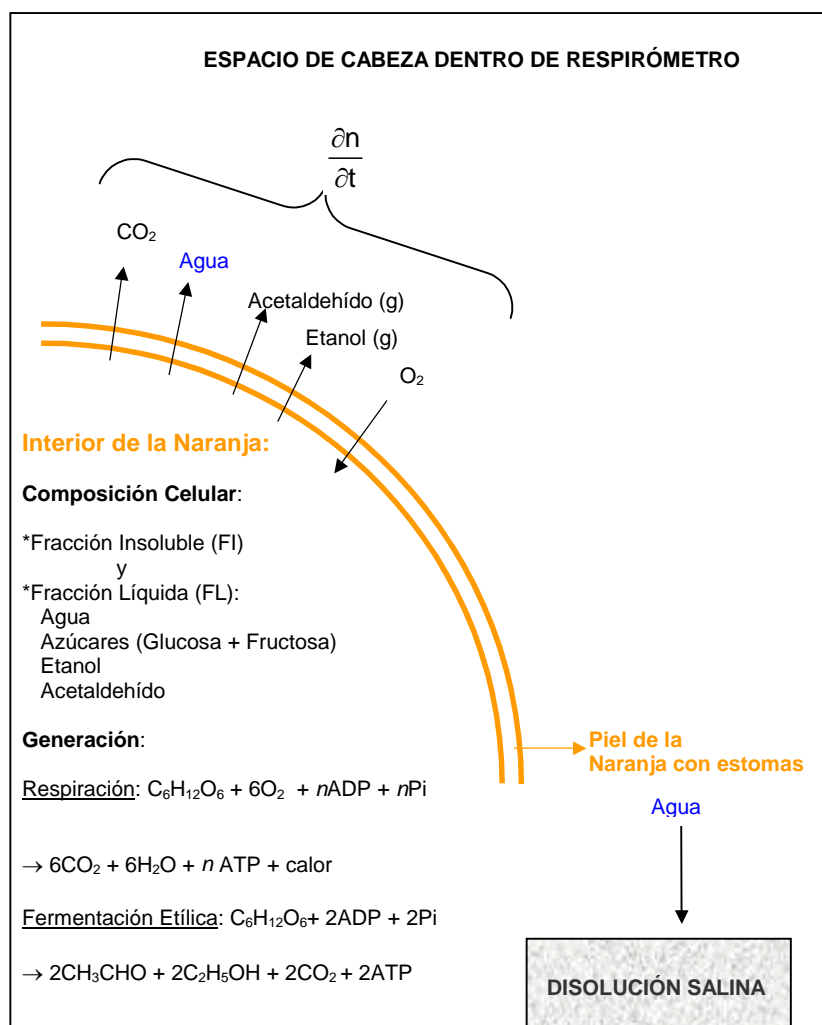


Fig. V.3.8. Esquema del sistema naranja-entorno dentro del respirómetro.

EVOLUCIÓN DE LAS TASAS RESPIRATORIAS

Aplicando la metodología propuesta en esta Tesis Doctoral, se realizaron medidas con el micro cromatógrafo de gases (mCG) de la variación de las fracciones molares de los siguientes 3 volátiles: CO₂, CH₃CHO y C₂H₅OH en el espacio de cabeza del respirómetro con respecto al tiempo del ensayo, de las frutas inoculadas y control. Estos volátiles se seleccionaron como indicadores

(entre otros volátiles que coexisten en el metabolismo frutal) del estado fisiológico de las frutas estudiadas en cada día analizado (0, 2^o, 3^o, 4^o, 7^o y 8^o).

En la Fig. V.3.9. se presentan los resultados obtenidos de las tasas respiratorias (TR_{CO_2}).

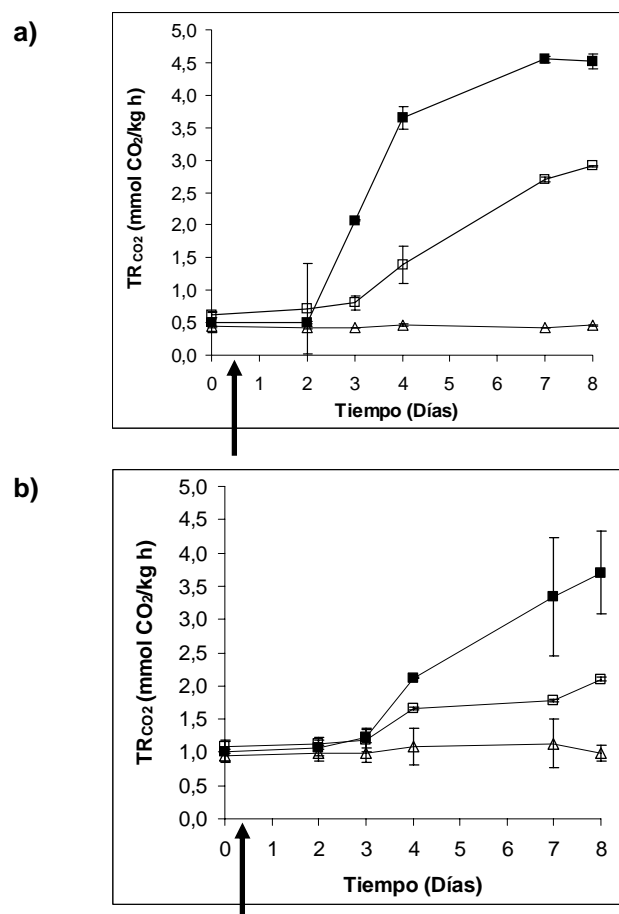


Fig. V.3.9. Evolución de las tasas respiratorias de naranjas Navelate inoculadas con: *P. digitatum* (■), *P. italicum* (□) y naranjas sin inocular (△). a) Lote 1 y b) Lote 2. (Flecha = momento de inoculación artificial).

En las naranjas control de ambos lotes la TR_{CO_2} permanece constante con el tiempo de almacenamiento, tal y como había sido constatada en un estudio

preliminar presentado con anterioridad. Sin embargo, los valores medios en cada uno de los lotes difieren entre sí, probablemente como consecuencia del distinto nivel de maduración de las muestras, constatado en la caracterización previa de la materia prima. Así, el lote 1, con menor índice de madurez presenta una TR_{CO_2} media de $0,439 \pm 0,006$ mmol/kg h, valores del orden de los encontrados en bibliografía para naranjas a 20°C (Arpaia y Kader, 2000). La fruta control perteneciente al lote 2, con mayor índice de madurez, presenta una TR_{CO_2} media de $1,02 \pm 0,17$ mmol/kg h.

Según Schiffmann-Nadel (1977), al medir el patrón respiratorio en diferentes cultivares de frutas cítricas a distintos tiempos de cosecha (diversos estadios de maduración) y condiciones de almacenamiento, encontró que los cambios fueron más que nada de naturaleza química y no tanto fisiológicos, dada la baja actividad fisiológica de los frutos cítricos. Los cambios que obtuvo fueron principalmente en el contenido en sólidos solubles totales, en acidez total y en el contenido de etanol, en limones sanos, más que en el patrón respiratorio y en la producción de etileno.

Según esto, y dado el desconocimiento de la trayectoria de la fruta antes de su llegada al laboratorio, esta diferencia en la tasa respiratoria entre lotes podría también atribuirse a diferencias en la temperatura de almacenamiento. Podría ser que las naranjas del lote 2 hubieran estado almacenadas, previo a recibirlas en nuestro laboratorio, a una temperatura que pudiera haberles originado un daño por frío y por eso estar aumentada su tasa respiratoria (Vines *et al.*, 1965; McCollum y McDonald, 1991; Eaks, 1980, Lyons, 1973; Biale y Young, 1981).

Las condiciones óptimas de almacenamiento y transporte frigorífico de naranjas recomendadas son de 3 a 8°C y 90-95% de HR para una duración de hasta 3 meses, dependiendo de la variedad, zona de producción y estado de madurez en el momento de la recolección. La mínima temperatura que asegura la ausencia de daños por el frío depende de la variedad, zona de producción y estado de madurez en la recolección (Arpaia y Kader, 2000).

Como puede observarse, en ambos lotes, la infección con *P. digitatum* ha originado un aumento mayor y más abrupto en la TR_{CO2} con el tiempo de almacenamiento que la infección por *P. italicum*, que muestra un aumento más moderado.

En el lote 1, las naranjas que inicialmente tenían una TR_{CO2} media de 0,50 ± 0,05 mmol/kg, como consecuencia de la infección con *P. digitatum*, su tasa respiratoria media aumenta, alcanzando, al 8º DPI una TR_{CO2} de 4,519 ± 0,002 mmol/kg h, significando una tasa de aumento total del 8,1. El aumento se comenzó a detectar al 2º DPI.

En el lote 2, las naranjas que inicialmente tenían una TR_{CO2} media de 1,02 ± 0,17 mmol/kg, como consecuencia de la infección con este mismo hongo, su tasa respiratoria media aumenta, alcanzando, al 8º DPI una TR_{CO2} de 3,7 ± 0,6 mmol/kg h, significando una tasa de aumento total del 2,6. Igualmente, el aumento se comenzó a detectar al 2º DPI.

En el lote 1, respecto a las naranjas inoculadas con *P. italicum* se observa que el aumento en las tasas respiratorias se produce al 2º DPI, partiendo de un valor medio de 0,63 ± 0,15 mmol/kg h y llegando a 2,91 ± 0,11 mmol/kg h al 8º DPI, representando una tasa de aumento del 3,6.

En el lote 2, las naranjas inoculadas con *P. italicum* muestran un aumento leve en las tasas respiratorias a partir del 2º DPI, partiendo de un valor medio de 1,08 ± 0,09 mmol/kg h y llegando a 2,10 ± 0,03 mmol/kg h al 8º DPI, representando una tasa de aumento del 0,94.

Se trata de naranjas inoculadas con esporas de *P. italicum* Wehmer o *P. digitatum* Saccardo, mohos que son típicos parásitos de herida que perduran en estado saprofitario sobre todo tipo de matriz vegetal y que entran en actividad cuando el fruto cítrico se encuentra en período avanzado de maduración o completamente maduro (Tuset, 1987). Son hongos aerobios que no son muy exigentes respecto a los nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción. Su único requisito es que tengan además de oxígeno del aire una buena fuente de carbono (Pitt, 1979) que lo obtienen del fruto cítrico. Al

reproducirse sus estructuras (micelio y esporas) se van acumulando en la superficie del fruto.

La aerobiosis en los frutos cítricos está condicionada por el buen funcionamiento de los estomas. Los mismos están formados por las células oclusivas y las células guardas que se encuentran al final de la ruta apoplástica. Dicha ruta regula el flujo de los gases, por lo tanto el poder cubriente del hongo podría ser el responsable de la obturación de las vías respiratorias y por tanto del desarrollo de fermentaciones.

Este comportamiento respiratorio en frutas infectadas que muestran un pico pronunciado al contrario de las frutas sanas cuyo padrón respiratorio es en general una línea que va declinando suavemente y de manera constante, fue obtenido en trabajos similares.

Abeles *et al.* (1992) han señalado que las plantas enfermas frecuentemente muestran un aumento en la respiración en respuesta al ataque de microorganismos.

Según Millerd y Scott (1962), cuando las plantas son infectadas por patógenos, la tasa respiratoria generalmente aumenta poco después de la invasión y luego aumenta mucho más a medida que el microorganismo se multiplica y el tejido vegetal comienza a deteriorarse.

En tomates inoculados con esporas de *Botrytis cinerea* el aumento en la producción de CO₂ se asoció con el desarrollo y la aparición de micelio y esporas en la piel deteriorada de las frutas (Polevaya *et al.*, 2002).

Pesis y Marinansky (1990) han reportado que el aumento en la producción de CO₂ en naranjas inoculadas con esporas de *P. digitatum* ocurrió durante la esporulación del hongo. El aumento de CO₂ en la fruta infectada podría deberse a la interacción fruta-hongo (Schiffmann-Nadel, 1977).

En naranjas Shamouti, inoculadas con *P. digitatum* y almacenadas a 22°C, Pesis y Marinanky (1991), obtuvieron aumentos de la TR_{CO2} desde 0,6 mmol/kg a tiempo cero hasta 6 mmol/kg al 7º DPI.

Schiffmann-Nadel (1977), obtuvo para limones inoculados con *P. digitatum* Saccardo y almacenados a 17°C, aumentos de las tasas respiratorias de 10 veces a los 8 DPI, siendo un poco más moderado (6 veces) el aumento en los limones inoculados con *P. italicum*.

Zauberman y Barkai-Golan (1975), inocularon naranjas de la variedad Valencia que almacenaron a 23°C, encontrando un aumento en la TR_{CO2} a los 5 días post inoculación (DPI), alcanzando el valor máximo al 8º DPI. Dicho aumento representó una tasa del 8,2.

Polevaya *et al.*, (2002) detectaron un aumento en la producción de generación de CO₂ en tomates (*L. Esculentum* Mill., cv F-144) inoculados con esporas de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., a partir del 4º DPI, partiendo de una TR_{CO2} de 0,35 a tiempo cero a 0,65 mmol/kg h.

Es posible que los cambios en los procesos fisiológicos normales de la fruta durante su senescencia hagan disminuir su resistencia y esto permita que sean atacados por hongos cuyas esporas han permanecido latentes desde su colecta y durante su almacenamiento.

Este fenómeno puede haber afectado de alguna manera a la expresión de la infección en estas naranjas tras su inoculación artificial, haciendo que el efecto de la infección fúngica sea más leve en el lote con IM elevado (lote 2) (IM = 21,405) haciendo que la variación en el aumento de la TR_{CO2} sea menor que el ocurrido en las naranjas del lote 1 con IM de 8,7.

Por otra parte, pequeñas variaciones en las condiciones de almacenamiento de los lotes (HR) también pueden haber influido en cierta manera en la respuesta fisiológica hacia los hongos, hecho que sería conveniente dilucidar en futuras investigaciones.

Frente a los resultados de las tasas respiratorias obtenidas cabe la interrogante de si este comportamiento respiratorio puede ser modelizable con algún modelo matemático interpretativo.

Existen varios modelos biológicos que reflejan el crecimiento de microorganismos en productos alimenticios y que su presencia puede tener relación con variaciones en algunos aspectos del metabolismo de los productos alimenticios que los albergan (Ingaramo *et al.*, 2003, Cayré *et al.*, 2003; Hertog *et al.*, 1999).

En el caso de las naranjas inoculadas con esporas de *P. digitatum* o *P. italicum*, los datos de las tasas respiratorias TR_{CO_2} ($mmol_{CO_2}/kg\ h$) calculadas con la metodología propuesta en este trabajo, fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal mediante la Ecuación V.3.17., ecuación modificada del modelo matemático de Gompertz (Gibson *et al.*, 1988). La elección de este modelo se hizo en base a que permite la descripción del crecimiento de hongos de pudrición blanca (Cruz –Córdoba *et al.*, 2003). Es un modelo cinético semiempírico de forma sigmoideal que puede describir el crecimiento, inactivación o sobrevivencia de distintos microorganismos (Chen y Hoover, 2003).

$$Y = Y_0 + \frac{\Delta Y}{1 + e^{-k(t-t_0)}} \quad (V.3.17.)$$

siendo:

Y_0 = valor inicial de la variable respuesta, valor de la tasa respiratoria inicial

ΔY = variación de la tasa respiratoria en la zona exponencial, asíntota en la curva

k = pendiente de la fase exponencial. Se define como la tangente en el punto de inflexión

t_0 = tiempo medio de la fase exponencial

El ajuste a la ecuación V.3.17. se realizó aplicando el algoritmo Marquardt, finalizando la estimación por la convergencia de la suma de cuadrados residual (regresión no lineal) con el programa estadístico STATGRAPHICS® Plus versión 4.1.

El resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el modelo de la ecuación modificada de Gompertz para las tasas respiratorias ($\text{mmol}_{\text{CO}_2} / \text{kg h}$) respecto al tiempo (t_0) de almacenamiento, en cada uno de los tratamientos analizados se presenta en la Tabla V.3.7.

Tabla V.3.7. Parámetros del modelo de Gompertz obtenidos para los 4 tratamientos de inoculación.

Parámetros de Gompertz	Lote 1		Lote 2	
	<i>P. italicum</i>	<i>P. digitatum</i>	<i>P. italicum</i>	<i>P. digitatum</i>
Y_0	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,2	1,10 ± 0,07	1,0 ± 0,2
ΔY	2,3 ± 0,1	4,1 ± 0,3	0,8 ± 0,1	2,5 ± 0,3
k	1,2 ± 0,3	1,9 ± 0,4	3,0 ± 1,7	2,1 ± 1,9
t_0	4,6 ± 0,2	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,2	4,1 ± 0,3
R^2	99	98	91	91
Desv típica residual	0,115	0,30	0,139	0,412

En los 4 tratamientos se obtuvo un buen ajuste de los datos experimentales al modelo, aunque la menor velocidad de crecimiento de los microorganismos observada en la fruta del lote 2, disminuye la bondad de los ajustes en este grupo.

Las figuras V.3.10. a V.3.13. muestran el ajuste de los datos experimentales a los valores predichos por el modelo en cada uno de los casos.

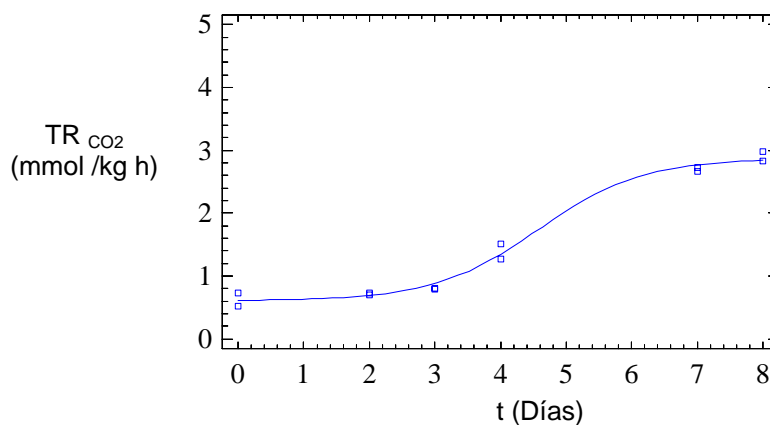


Fig. V.3.10. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 1 inoculadas con *P. italicum*, almacenadas a 21°C y 75,5% HR.

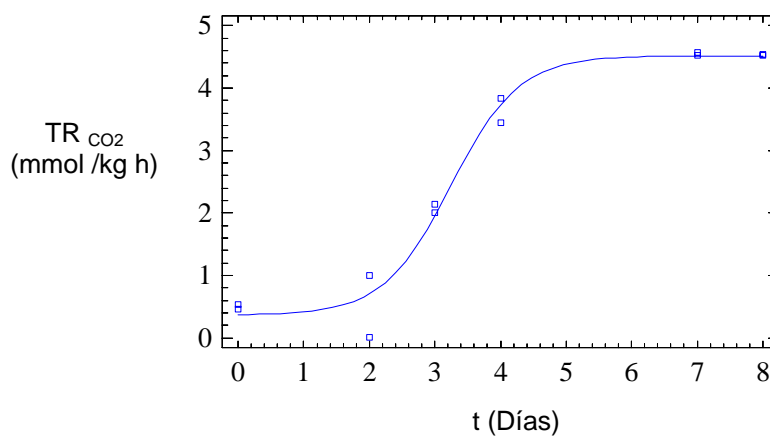


Fig. V.3.11. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 1 inoculadas con *P. digitatum*, almacenadas a 21°C y 75,5% HR.

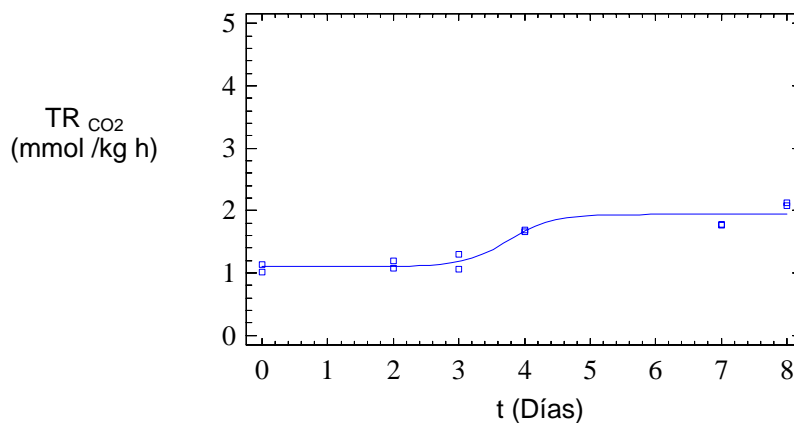


Fig. V.3.12. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 2 inoculadas con *P. italicum*, almacenadas a 21°C y 85% HR.

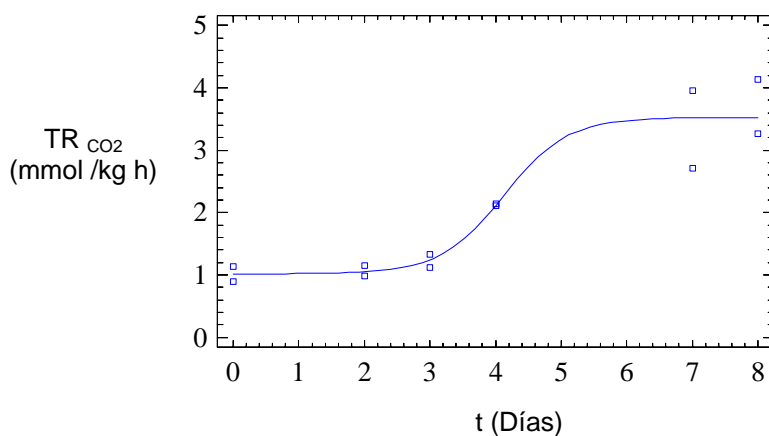


Fig. V.3.13. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 2 inoculadas con *P. digitatum*, almacenadas a 21°C y 85% HR.

Se concluye que los datos experimentales fueron correlacionados con el modelo cinético semiempírico de la ecuación modificada del modelo de Gompertz exhibiendo un buen ajuste al mismo, lo que permite representar la

tendencia de la variación de las tasas respiratorias (TR_{CO_2}) de las frutas inoculadas con esporas de *P. italicum* o *P. digitatum* con respecto al tiempo de almacenamiento.

V.3.6.2. EVOLUCIÓN DE LA SUPERFICIE DE INFECCIÓN

La detección de la infección en las frutas inoculadas por signos visuales de alteración de la corteza, en cuanto a su aspecto (cambio de coloración), textura (aparición de zonas blandas y exudados líquidos), aparición de micelio blanco y esporas color verde oliva seco para las inoculadas con esporas de *P. digitatum* Saccardo y verde-azuladas para las inoculadas con esporas de *P. italicum* Wehmer en torno a los 4 puntos de inoculación de cada fruta fueron medidos con pie de rey cada día durante el tiempo de almacenamiento.

Dado que se inoculó a las frutas con esporas, el proceso infeccioso que se producirá es la germinación de las mismas (formación de una pequeña hifa (tubo germinativo) que ya sea por presión directa sobre la cutícula y epidermis, a través de discontinuidades de esta última provocadas (heridas o fisuras) o naturales (estomas y lenticelas) o también mediante reacciones enzimáticas que ablandan los tejidos epidérmicos, intenta introducirse en las capas internas de la corteza (Tuset, 1987).

En las Figuras V.3.14.; V.3.15.; V.3.16. y V.3.17. se presentan los registros fotográficos de los procesos infecciosos correspondientes a los días en los que se realizaron las determinaciones de las tasas respiratorias, de cada uno de los tratamientos realizados.

Se observa en la Figura V.3.14. (e., f. y g.) que el desarrollo de los signos visuales de la infección en la corteza de las frutas inoculadas con esporas de *P. italicum* del lote 1 (IM = 8,7) y almacenadas a 75,5% HR fue discreto. Se detectan los primeros signos visibles (zona reblandecida, húmeda y de color más oscuro que el resto de la superficie, en torno a casi todos los puntos de inoculación) al 4º DPI. Al 7º DPI se aprecian manchas circulares relativamente amplias, alrededor de los puntos de inoculación de color marrón verdoso con

algunas zonas de micelio blanquecino y esporas verdes. Al 8º DPI (Fig. V.3.14.g.) el porcentaje medio de superficie dañada por la infección alcanzó el $15,6 \pm 4\%$ de la superficie total de las frutas, representando un incremento de la superficie dañada del 8,4% desde el 4º DPI.

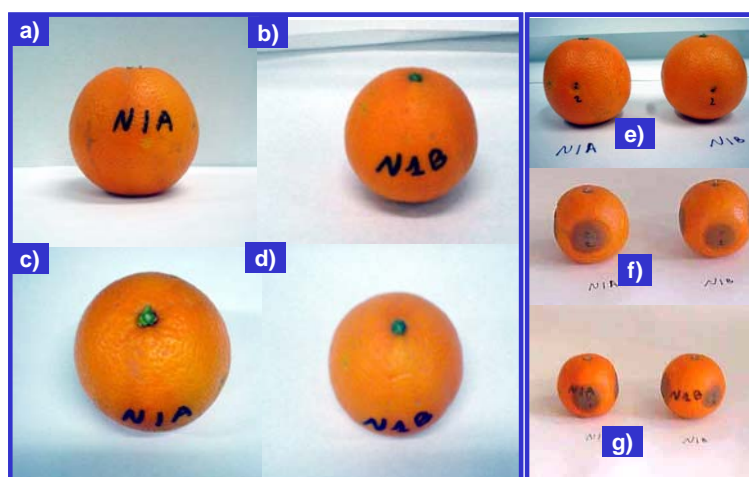


Fig. V.3.14. Desarrollo de infección fúngica de naranjas Navelate (lote 1) inoculadas con esporas de *P. italicum* Wehmer, almacenadas a 21°C y 75,5% HR. a) y b) Vista ecuatorial de ambas naranjas previo a la inoculación. c) y d) Vista apical de ambas naranjas previo a la inoculación. e) 4º DPI. f) 7º DPI. g) 8º DPI.

Además, se aprecia en ambas frutas una leve pérdida de la esfericidad de las mismas a medida que avanza la infección al observarse al 7º y 8º DPI un ligero aspecto plano en las zonas de inoculación (Fig. V.3.14. f. y g.).

Esto podría explicarse por la pérdida de turgencia por la acción de las pectinasas que va secretando el moho en su proceso infeccioso. La acción de estas enzimas va degradando las paredes celulares que conforman la corteza, lo que le va permitiendo al moho la penetración en los tejidos internos de la misma y el inicio de la colonización del resto del fruto (Tuset, 1987). En este proceso también se fue perdiendo agua por las zonas alteradas y dado que la

infección ha transcurrido en un ambiente húmedo (75,5% HR), el fruto se descompuso blandamente con exudados acuosos.

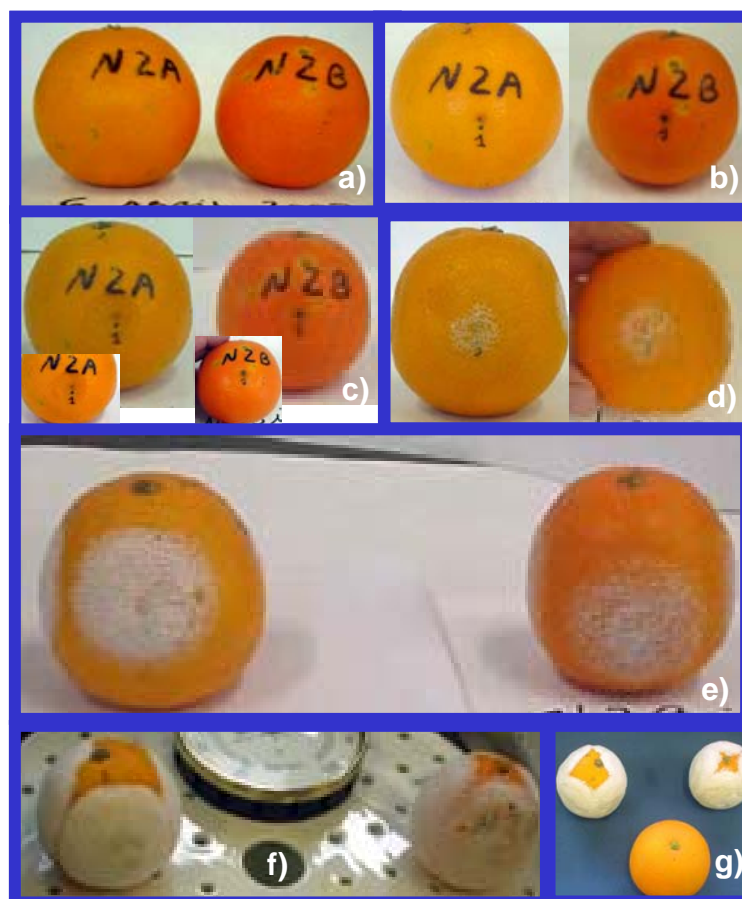


Fig. V.3.15. Desarrollo de infección fúngica de naranjas Navelate (lote 1) inoculadas con esporas de *P. digitatum* Saccardo, almacenadas a 21°C y 75,5% HR. a) Previo a la inoculación. b) 2º DPI. c) 3^{er} DPI (con ampliación zona dañada). d) 4º DPI. e) 7º DPI. f) 8º DPI. g) 9º DPI; comparación con naranja sin inocular del mismo lote.

En el caso de las naranjas inoculadas con esporas de *P. digitatum* del lote 1, almacenadas a 75,5% HR (Fig. V.3.15.), la evolución de la infección fue más rápida en el sentido de que los primeros signos visibles se detectaron al 3^{er} DPI (un día antes que con *P. italicum*) alrededor de todos los puntos de inoculación, representando un $10 \pm 4\%$ de la superficie total (Fig. V.3.15.c.). En esta figura se muestran de manera ampliada 2 puntos de inoculación y la irradiación de la infección alrededor de los mismos revelando zonas más oscuras y de textura más blanda que el resto de la corteza no dañada de morfología plana.

Al 7^o DPI (Fig. V.3.15.e.) se observaron manchas circulares relativamente amplias constituidas por micelio blanco en todos los puntos de inoculación de ambas frutas.

Al 8^o DPI (Fig. V.3.15.f.) la infección representó el $91 \pm 14\%$ (un aumento del 8% respecto del 3^{er} DPI). Sobre las manchas blancas de micelio se aprecian puntos de un color verdoso tenue producido por las esporas que comienzan a visualizarse.

En este caso se ha agregado el registro fotográfico del 9^o DPI en el que se compara la superficie de las naranjas inoculadas con una naranja control (sin inocular) del mismo lote.

Durante el proceso infeccioso se produjeron exudados acuosos importantes con el consiguiente ablandamiento de los frutos.

Respecto al proceso infeccioso de las frutas inoculadas con esporas de *P. italicum* del lote 2 (IM = 21,4) y almacenadas a 85% HR (Fig. V.3.16.), se observó, por un lado, un desarrollo discreto en cuanto al porcentaje medio total de superficie de corteza dañada. El porcentaje medio de superficie de corteza dañada en el 2^o DPI fue pequeño ($0,36 \pm 0,06\%$). Por otro, que se produjo de una forma rápida desde el punto de vista de la detección de la infección puesto que se descubrieron los primeros síntomas visuales al 2^o DPI (Fig. V.3.16.a.) representando éste el menor de los tiempos de detección de los 4 tratamientos estudiados.

Al 4º DPI el porcentaje de superficie de corteza infectada alcanzó un $1,77 \pm 0,07\%$ (Fig. V.3.16.b.), al 7º DPI el $8,9 \pm 0,7\%$ (Fig. V.3.16.c.) y al 8º DPI el $13 \pm 1\%$, representando un incremento total respecto del 2º DPI del 36% (Fig. V.3.16.d.). En este día (8º DPI) las manchas fueron discretas, de color marrón y de textura más blanda y húmeda que en el resto de la corteza. En la zona del punto de inoculación se visualizaron esporas de color verde azulado.

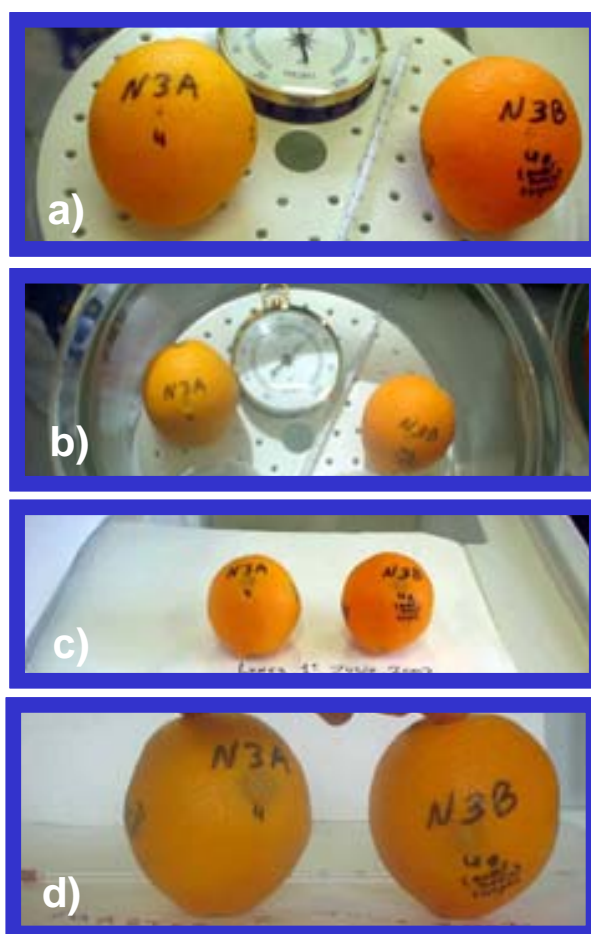


Fig. V.3.16. Desarrollo de infección fúngica de naranjas Navelate (lote 2) inoculadas con esporas de *P. italicum* Wehmer, almacenadas a 21°C y 85% HR. a) 2º DPI. b) 4º DPI. c) 7º DPI. d) 8º DPI.

En este tratamiento, durante el proceso infeccioso no se observó una pérdida de esfericidad. La causa tal vez podría ser que las naranjas del lote 2 tenían un volumen mucho mayor que las del lote 1 y la pérdida de agua y por ende de consistencia por efecto de la infección se notaría en un tiempo mayor que los 8 días observados.

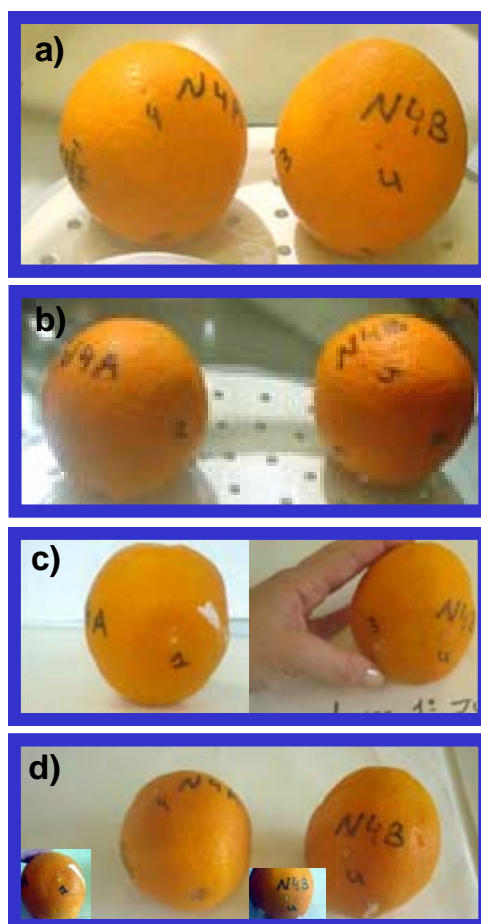


Fig. V.3.17. Desarrollo de infección fúngica de naranjas Navelate (lote 2) inoculadas con esporas de *P. digitatum* Sacc. almacenadas a 21°C y 85% HR. a) 12 horas tras inoculación. b) 4º DPI. c) 7º DPI. d) 8º DPI con ampliación de zonas inoculadas.

Con relación a las naranjas del lote 2 (IM = 21,4) inoculadas con esporas de *P. digitatum* y almacenadas a 85% HR, se observa que los signos visuales de la infección se pueden detectar al 4º DPI. Al 8º DPI, el porcentaje medio de superficie dañada fue de $83 \pm 19\%$ (Fig. V.3.17.d.), representando un incremento del 7% con respecto al 4º DPI.

Tanto al 7º como al 8º DPI (Fig. V.3.17.c. y d.) se pueden observar zonas de micelio blanco alejadas de los puntos de inoculación y alguna zona pequeña de esporas verdosas que corresponde a uno de los puntos de inoculación.

En este tratamiento sí se quedó alterada la consistencia de las frutas a lo largo del proceso infeccioso; en especial a partir del 7º DPI, denotándose abundantes zonas reblandecidas y exudados acuosos en ambas frutas.

Para el cálculo de las medidas de la superficie infectada (S_h) total de la fruta se consideró la suma de las 4 subzonas de superficie herida correspondientes a los 4 puntos de inoculación en la zona ecuatorial, las cuales tomaron la forma de casquetes. En cada una de ellas se midió el radio de las zonas alteradas, calculándose su superficie por la resolución de la ecuación de la Integral de la Superficie de Revolución de Riemann (según descrito en Materiales y Métodos).

La evolución de la superficie total infectada en cada uno de los tratamientos se muestra en la Fig. V.3.18.

Como se ha comentado anteriormente, la infección por *P. digitatum* resulta mucho más agresiva que la de *P. italicum*, lo que había sido constatado a través del análisis de tasas respiratorias.

De forma general, a partir del tercer día postinoculación empiezan a aparecer los primeros síntomas de infección, más o menos intensos dependiendo de la especie de microorganismo.

La gran dispersión en el valor de la desviación en los tratamientos con *P. digitatum*, podría explicarse teniendo en cuenta que las frutas en estado avanzado de la infección y con su corteza deteriorada, pierden turgencia

haciéndose más laxa la superficie cortical, generándose ablandamientos por exudados de metabolitos. Esto contribuye a la pérdida de esfericidad de los casquetes analizados, con los consiguientes errores cometidos con el método de cálculo considerado.

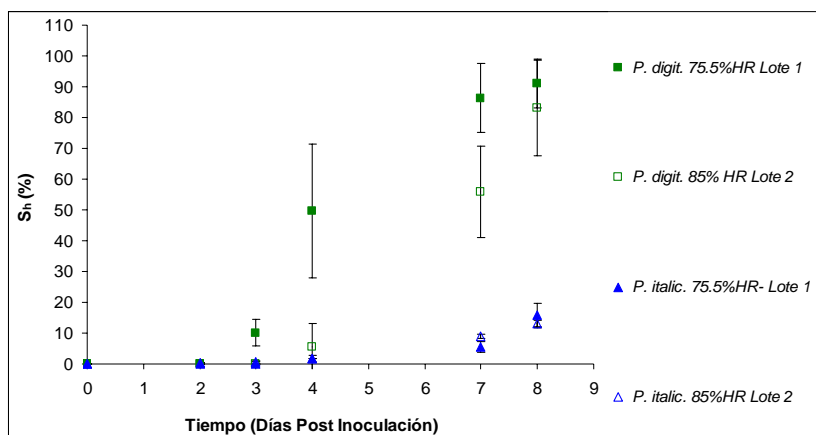


Fig. V.3.18. Superficie de heridas (S_h) vs Tiempo de las naranjas inoculadas con esporas de *Penicillium* sp.

Frente a los resultados del porcentaje de superficie de heridas (S_h) (%) obtenidos en los distintos tratamientos de inoculación artificial cabe el interrogante si los mismos son factibles de ajustar a algún modelo matemático de interpretación de dichos comportamientos.

El porcentaje de superficie de heridas en cada uno de los tratamientos fueron ajustados mediante un modelo de regresión no lineal a la ecuación modificada del modelo matemático de Gompertz (Ec. V.3.17.).

Los valores de los parámetros obtenidos mediante el ajuste con este modelo se presentan en la Tabla V.3.8.

Los datos experimentales fueron correlacionados con el modelo cinético semiempírico de la ecuación modificada del modelo de Gompertz exhibiendo un buen ajuste al mismo, lo que permite representar la tendencia de la variación de la superficie de heridas (S_h) (%) de las frutas inoculadas con

esporas de *P. italicum* o *P. digitatum* con respecto al tiempo de almacenamiento.

Tabla V.3.8. Parámetros de Gompertz obtenidos para los 4 tratamientos.

Parámetros de Gompertz	Lote 1		Lote 2	
	<i>P. italicum</i>	<i>P. digitatum</i>	<i>P. italicum</i>	<i>P. digitatum</i>
ΔY	51 ± 489	88 ± 5	25 ± 6	109 ± 40
k	1,3 ± 3,2	2,3 ± 0,8	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,5
t_0	9 ± 13	3,89 ± 0,13	7,8 ± 0,6	7 ± 1
R^2	93,5	95,5	99,5	95,03

Las figuras V.3.19. a V.3.22. muestran el ajuste de los datos experimentales a los valores predichos por el modelo en cada uno de los casos.

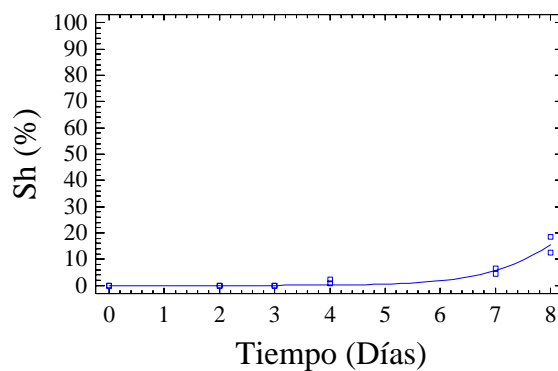


Fig. V.3.19. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 1 inoculadas con *P. italicum* almacenadas a 21°C y 75,5% HR.

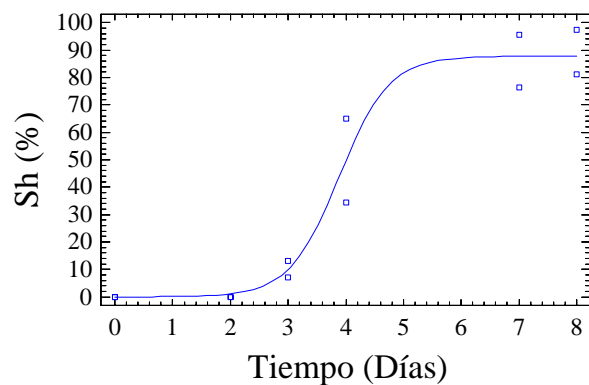


Fig. V.3.20. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate del lote 1 inoculadas con *P. digitatum* almacenadas a 21°C y 75,5% HR.

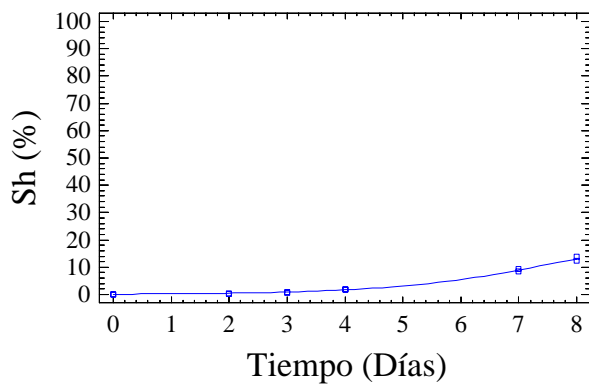


Fig. V.3.21. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate lote 2 inoculadas con *P. italicum* almacenadas a 21°C y 85% HR.

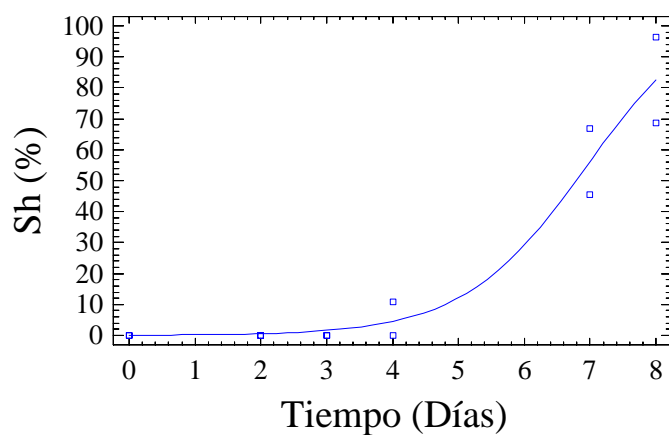


Fig. V.3.22. Ajuste del modelo de Gompertz a los puntos experimentales para naranjas var. Navelate lote 2 inoculadas con *P. digitatum* almacenadas a 21°C y 85% HR.

V.3.6.3. RELACIÓN ENTRE TASAS RESPIRATORIAS Y DESARROLLO EN SUPERFICIE

Como resumen de los apartados anteriores, las figuras V.3.23. y V.3.24. muestran los cambios en la actividad respiratoria de la fruta inoculada con el tiempo de almacenamiento junto con el desarrollo de los síntomas visibles de la infección.

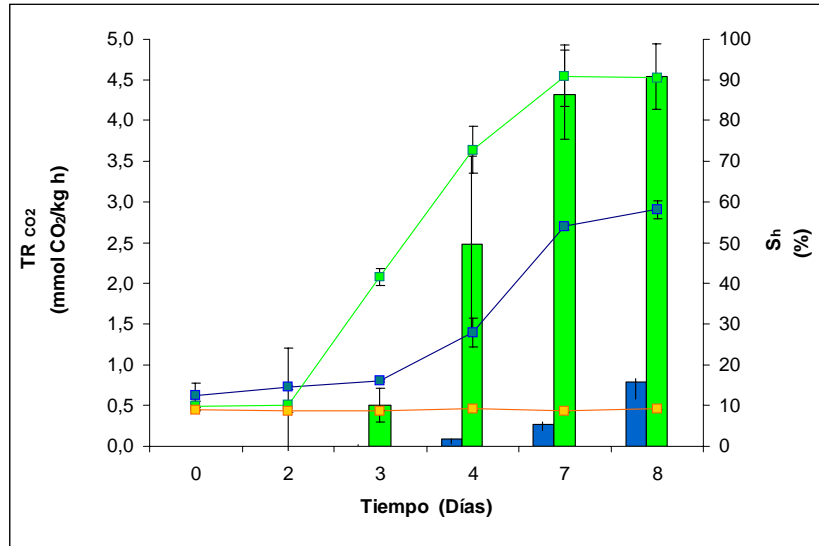


Fig. V.3.23. Tasa respiratoria media (TR_{CO2}) y porcentaje medio de superficie de heridas (S_h) vs tiempo de almacenamiento a 21°C y 75,5% HR. Naranjas lote 1. Inoculadas con *P. digitatum* (■), con *P. italicum* Wehmer (■) y sin inocular (■).

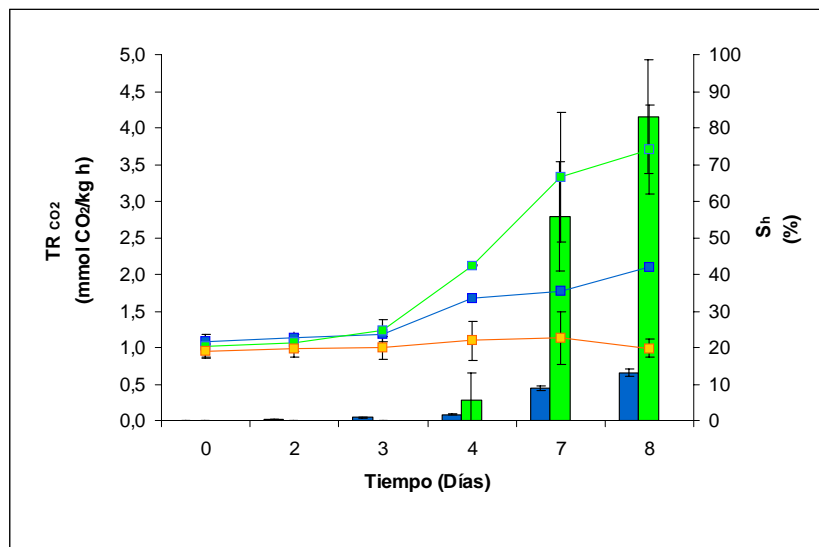


Fig. V.3.24. Tasa respiratoria media (TR_{CO2}) y porcentaje medio de superficie de heridas (S_h) vs tiempo de almacenamiento a 21°C y 85% HR. Naranjas lote 2. Inoculadas con *P. digitatum* (■), con *P. italicum* Wehmer (■) y sin inocular (■).

Como puede observarse, se produjeron aumentos en las tasas respiratorias durante los 8 días de almacenamiento postinoculación en las naranjas inoculadas de ambos lotes. Dichos aumentos se detectaron siempre antes de que se observaran signos visuales de infección para ambos mohos en las frutas inoculadas.

La mayor agresividad del *P. digitatum* se manifiesta, tanto a través del avance en la superficie de la fruta infectada, como en aumentos importantes en las tasas de respiración analizadas.

V.3.6.4. DESARROLLO DE OTROS COMPONENTES VOLÁTILES

El aroma y el flavor de las naranjas consisten en una gran variedad de compuestos volátiles, entre ellos aldehídos y alcoholes (Pino *et al.*, 1986 a, b).

Varios productos gaseosos del metabolismo, como el anhídrido carbónico (CO₂), el etileno (C₂H₄), el acetaldehído (CH₃CHO) y el etanol (C₂H₅OH) se han utilizado como bioindicadores para evaluar y detectar alteraciones organolépticas, fisiológicas y patológicas (Couey, 1982).

El acetaldehído y el etanol, compuestos volátiles de frutas y otros tejidos vegetales que aparecen especialmente en ambientes pobres en oxígeno (Crwickshank *et al.*, 1992), son generados en los procesos de fermentación etílica en estado líquido, disolviéndose en la fase líquida y alcanzando rápidamente un equilibrio con la fase gaseosa aumentando su concentración en la misma (IFPSC, 2004). Dicha aparición en la fase gaseosa genera una difusión de los mismos hacia el espacio de cabeza, donde pueden ser analizados y detectados.

Por tanto, y con la metodología de análisis planteada en este trabajo, a través de la cuantificación de gases en el espacio de cabeza, se está cuantificando la cantidad de acetaldehído y etanol en fase gas en equilibrio con la fase líquida.

En las frutas control no se detectó ni acetaldehído ni etanol en su espacio de cabeza durante los 8 días de almacenamiento en ninguno de los 2 lotes.

Las figuras V.3.25. y V.3.26. muestran la evolución con el tiempo de almacenamiento de la variación de la concentración de estos gases en el espacio de cabeza analizado en frutas inoculadas.

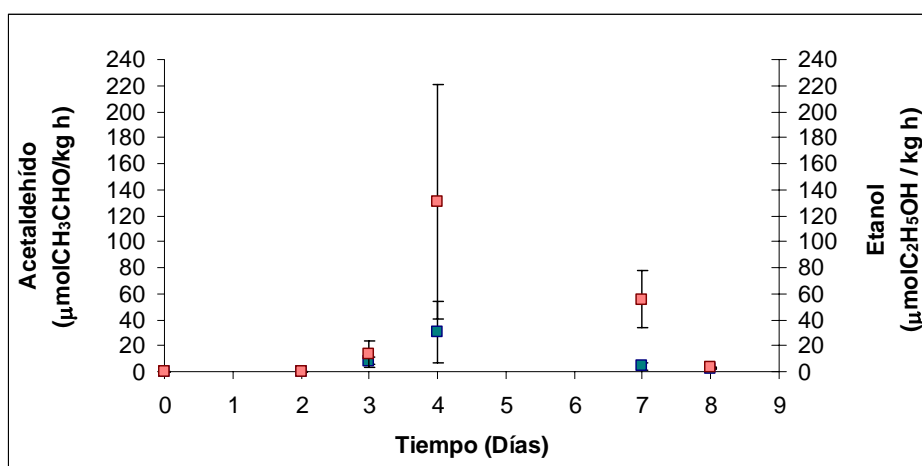


Fig. V.3.25. Evolución de la variación de acetaldehído (■) y etanol (■) en el espacio de cabeza de naranjas var. Navelate (lote 1) inoculadas con *P. digitatum* vs tiempo de almacenamiento

Como puede observarse, en las frutas pertenecientes al lote 1, únicamente se detectó la presencia de acetaldehído y de etanol en el espacio de cabeza de naranjas inoculadas con *P. digitatum* a partir del 3^{er} DPI, momento en el que comienzan a detectarse los primeros síntomas visibles de la infección (Fig. V.3.25.). Esta detección de acetaldehído y etanol estaría indicando un cambio en las rutas metabólicas, desplazando la respiración hacia la vía fermentativa. A muy bajas concentraciones internas de O₂, el aceptor terminal de electrones en el sistema electrónico de transporte, la citocromo oxidasa, cesa de funcionar. Cuando la inhibición ocurre, el 2NADH no puede ser oxidado a 2NAD⁺ y entrar en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Entonces la oxidación se produce fermentando el ácido pirúvico en el citosol. El NADH se oxida

aceptando como sustrato al piruvato para formar acetaldehído que a su vez es reducido a etanol.

El bajo rendimiento energético que se produce bajo condiciones anaeróbicas (mucho más glucosa debe ser oxidada para mantener el nivel energético que la célula necesita) implica aumentos importantes en la tasa respiratoria, lo que fue constatado a través del aumento en la producción de CO₂ visto en el apartado anterior.

Es de destacar el comportamiento de ambos volátiles, observándose en ambos casos una producción máxima al 4º DPI, descendiendo luego hasta valores muy bajos.

Resultados similares fueron encontrados por otros autores en naranjas Shamouti, inoculadas con esporas de *P. digitatum* (Pesis y Marinansky, 1990). En tomates inoculados con esporas de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., el CH₃CHO detectado en el espacio de cabeza por cromatografía gaseosa aumentó también entre los 3 y 5 DPI para luego comenzar una fase de declive.

Este hecho podría atribuirse, en principio, a un nuevo desplazamiento de las rutas metabólicas hacia la vía de los ácidos tricarbóxicos, con respiraciones aerobias. Sin embargo, el hecho de que continúen detectándose tasas de emisión de CO₂ crecientes hace poco probable esta causa.

Probablemente, las bajas tasas de emisión de acetaldehído y etanol detectadas a partir de un determinado momento estarían relacionadas con la conversión del acetaldehído en etil acetato, compuesto de la vía fermentativa no analizado en este trabajo.

La conversión de acetaldehído a etanol es catalizada por el enzima alcohol deshidrogenasa (Pesis y Ng, 1984b) y la transformación del acetaldehído en etil acetato podría explicarse por la conversión vía acetil Co A (Cossins, 1978). El retraso en la producción de etil acetato podría deberse a una necesidad de tiempo para sintetizarse a partir de la acetil Co A y el etanol. Norman y Craft (1971) mostraron que la producción de etil acetato en frutas cítricas bajo una atmósfera de nitrógeno apareció más tarde que otros volátiles anaerobios.

En este sentido, Pesis y Marinansky (1990) observaron una mayor emisión de etanol y etil acetato en frutas infectadas comparado con la cantidad de acetaldehído encontrado, sugiriendo que existe una rápida conversión de acetaldehído a etanol y etil acetato.

Sin embargo, en el lote 2, en las naranjas inoculadas con *P. digitatum* se detectaron acetaldehído y etanol al 7º DPI y en las naranjas inoculadas con *P. italicum* empezó a detectarse etanol al 8º DPI (Fig. V.3.26.).

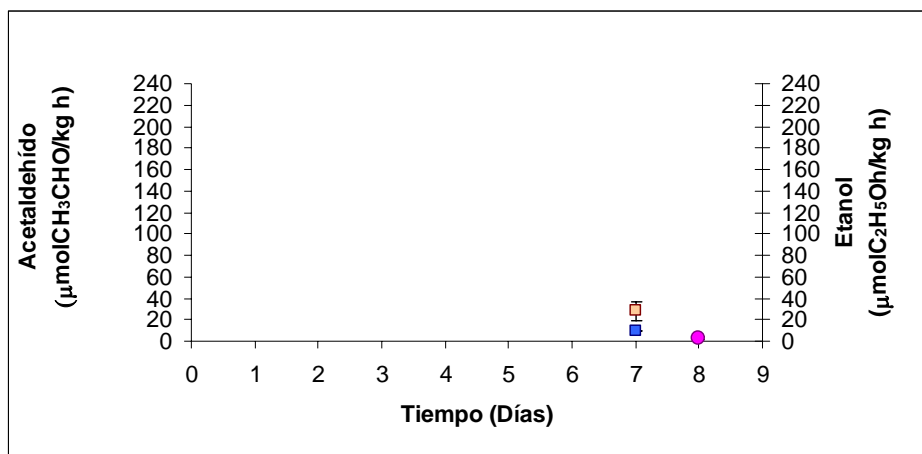


Fig. V.3.26. Evolución de la variación de acetaldehído (■) y etanol (■) en el espacio de cabeza de naranjas var. Navelate (lote 2) inoculadas con *P. digitatum* y etanol (●) en frutas inoculadas con *P. italicum* vs tiempo de almacenamiento

Las bajas tasas de volátiles detectadas en este lote están íntimamente relacionadas con la menor emisión de CO₂, producto de la respiración, observadas anteriormente. En este caso, las condiciones anaeróbicas se alcanzan con posterioridad, no detectándose volátiles característicos de la vía fermentativa hasta el final del período analizado.

Teniendo en cuenta que el desarrollo de micelio en la fruta (analizado como porcentaje de superficie recubierta) fue muy similar en ambos lotes para cada uno de los microorganismos, no parece existir una relación directa entre la

emisión de los compuestos volátiles analizados y la cantidad de microorganismos presentes, sino que más bien, el desarrollo de éstos estaría ligado al propio metabolismo de la fruta.

Algunos trabajos anteriores apuntan en este sentido. Así, Pesis y Marinansky (1990) detectaron aumentos en la emisión de acetaldehído y etanol, entre otros volátiles, en naranjas inoculadas con *P. digitatum* producidos mayoritariamente por el tejido frutal y no por el hongo, puesto que la producción de estos dos metabolitos fue muy baja *in vitro*.

Durante su desarrollo, el microorganismo se encuentra en condiciones aerobias, no emitiendo, por tanto, volátiles característicos de procesos fermentativos.

V.3.6.5. IMPACTO DEL AVANCE DE LA INFECCIÓN SOBRE LOS METABOLISMOS ENERGÉTICOS CELULARES

Como se ha visto en los resultados precedentes, el metabolismo de la fruta sufre importantes cambios como consecuencia de un estrés patológico de tipo fúngico, poniendo en marcha mecanismos que derivan parte de su respiración aerobia hacia respiraciones anaerobias o fermentaciones. Además, con la metodología de análisis utilizada, la evolución de gases en el espacio de cabeza cuantificará los gases producidos por la propia respiración del microorganismo.

A continuación se postula un modelo que pretende describir las componentes respiratorias que conformarían el aumento de la tasa respiratoria registrado en las frutas inoculadas, relacionando las variables del sistema naranja-entorno: CO₂ (total, respiratorio, fermentativo) y el poder cubriente del microorganismo inoculado.

Remitiendo a la Fig. V.3.8., la variación del número de moles totales (n_T) de CO₂ respecto al tiempo de análisis en el espacio de cabeza, será igual a la suma de la variación del número de moles de CO₂ originados por la respiración

de la fruta y del hongo (n_R) y el número de moles de CO_2 originados por la fermentación alcohólica (n_F).

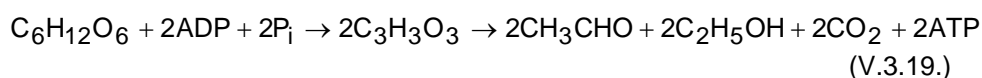
Por tanto, la evolución del sistema con el tiempo en base a la componente metabólica total ($\partial n_{\text{CO}_2}/\partial t|_T$) puede expresarse en función de sus subcomponentes respiratoria ($\partial n_{\text{CO}_2}/\partial t|_R$) y fermentativa ($\partial n_{\text{CO}_2}/\partial t|_F$) (Ec. V.3.18.).

$$\left. \frac{\partial n_{\text{CO}_2}}{\partial t} \right|_T = \left. \frac{\partial n_{\text{CO}_2}}{\partial t} \right|_R + \left. \frac{\partial n_{\text{CO}_2}}{\partial t} \right|_F \quad (\text{V.3.18.})$$

El término $\left. \frac{\partial n_{\text{CO}_2}}{\partial t} \right|_T$ se obtiene de la variación de concentración de CO_2 en el espacio de cabeza, con la que se calcula la variación en la tasa respiratoria total ($\text{mmol CO}_2 / \text{kg h}$), tanto de las naranjas inoculadas como de las sanas (control).

El término $\left. \frac{\partial n_{\text{CO}_2}}{\partial t} \right|_F$ puede obtenerse a partir de la estequiometría de la fermentación etílica. El NADH se oxida aceptando como sustrato al piruvato para formar acetaldehído y posteriormente etanol.

La reacción de la fermentación alcohólica (Mauseth, 1995) puede resumirse según la ecuación V.3.19.:



de donde se desprende que la variación del número de moles de anhídrido carbónico (CO_2) por unidad de tiempo en la fermentación (F) será igual a la variación del número de moles de etanol (E) por unidad de tiempo en la fase líquida (FL) (Ec. V.3.20.).

$$\left. \frac{\partial n_{\text{CO}_2}}{\partial t} \right|_F = \left. \frac{\partial n_E}{\partial t} \right|_{\text{FL}} \quad (\text{V.3.20.})$$

Por tanto, conociendo la variación del número de moles de etanol en la fase líquida podría determinarse la tercera componente de la ecuación V.3.18., la contribución de la componente respiratoria aerobia (incluida la respiración de la fruta como la del hongo).

Para el cálculo de la variación del número de moles de etanol en la fase líquida $\left(\left. \frac{\partial n_E}{\partial t} \right|_{\text{FL}} \right)$ es necesario determinar el número total de moles de fracción líquida presente en la naranja.

La figura V.3.27. muestra el proceso de cálculo necesario.

La fase líquida de la naranja estará constituida principalmente por agua, azúcares (glucosa y fructosa como solutos mayoritarios en la naranja) y otros compuestos generados por la actividad metabólica (como etanol y acetaldehído). Como estos últimos suponen una fracción muy minoritaria con respecto a las otras, podrán ser despreciadas en el cálculo.

Por tanto, puede determinarse la fracción molar de agua en la fase líquida según la ecuación de Norrish (1966), que permite correlacionar en fases líquidas de alimentos sus fracciones molares con la actividad de agua (Ec. V.3.21.):

$$a_w = x_w \exp(-K \cdot x_S^2) \quad (\text{V.3.21.})$$

donde:

a_w : actividad de agua de la disolución

x_w : fracción molar del agua en la fase líquida (FL) de la fruta
($\text{mol}_w/\text{mol}_{\text{FL}}$)

x_S : fracción molar del soluto en la fase líquida (FL) de la fruta
($\text{mol}_{\text{solute}}/\text{mol}_{\text{FL}}$)

K: constante de proporcionalidad característica de cada soluto. Tanto para la glucosa como para la fructosa, $K = 2,25$ (Martínez Navarrete *et al.*, 1998).

La actividad de agua (a_w) de la piel de la naranja es la misma que la humedad relativa (ϕ) del espacio de cabeza equilibrada con la disolución de sal utilizada. Por tanto, conocida la a_w en cada uno de los ensayos (0,755 y 0,85), puede determinarse la fracción molar de agua en la fase líquida aplicando la ecuación de Norrish mediante un cálculo iterativo (Figura V.3.27.).

Por otra parte, la fracción molar de etanol y acetaldehído en la fracción líquida pueden calcularse a partir de la fracción molar de ambos gases en la fase gas, aplicando la ecuación de Henry (Ec. V.3.22.):

$$p_i = H_i \cdot x_i \quad (\text{V.3.22.})$$

donde:

p_i :presión parcial del gas en el espacio de cabeza

H_i : constante de la ecuación de Henry, cuyos valores son:

Etanol $5,1- 6,3 \times 10^{-06}$ (atm.m³/mol) (IFPSC, 2004)

Acetaldehído $7,89 \times 10^{-05}$ (atm.m³/mol) (CHEMFATE, 1994)

x_i : fracción molar en fase líquida de cada compuesto.

Conocidas, por tanto, las fracciones molares de cada uno de los componentes presentes en la fase líquida (agua, azúcares, acetaldehído y etanol), y conocidos los pesos moleculares de cada uno de ellos, se puede calcular el peso molecular de la fracción líquida.

Una vez conocida esta, determinamos el número de moles en la fracción líquida, teniendo en cuenta que su peso molecular está relacionado con la masa total del fruto y su contenido en zumo.

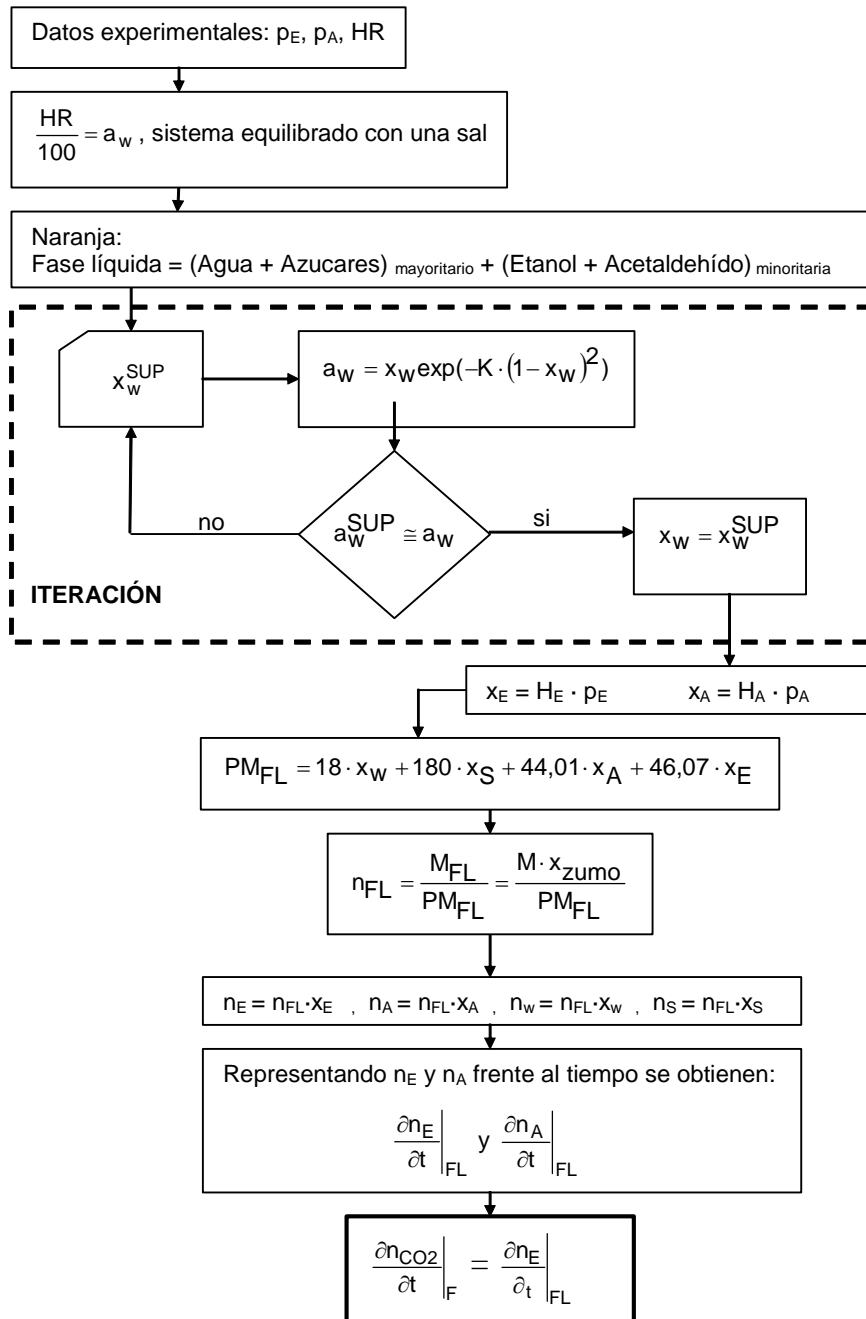


Fig. V.3.27. Esquema de cálculo de la variación de moles de etanol y acetaldehído.

Por tanto, conocidos los moles de fracción líquida, estamos en disposición de calcular los moles de cada uno de los componentes (agua, azúcares, etanol y acetaldehído).

De esta forma se determinaron para cada uno de los análisis del espacio de cabeza de las naranjas inoculadas y control los moles de etanol en fase líquida.

Una vez obtenido el término $\left. \frac{\partial n_{CO_2}}{\partial t} \right|_R$ de la Ecuación V.3.18., se determinó la tasa respiratoria (TR_R), y conocido el valor inicial de la tasa respiratoria (TR_{R0}), se modelizó el incremento relativo ($\Delta TR_R / TR_{R0}$) con la superficie infectada (S_h) (%) (Fig. V.3.28. y Fig. V.3.29.).

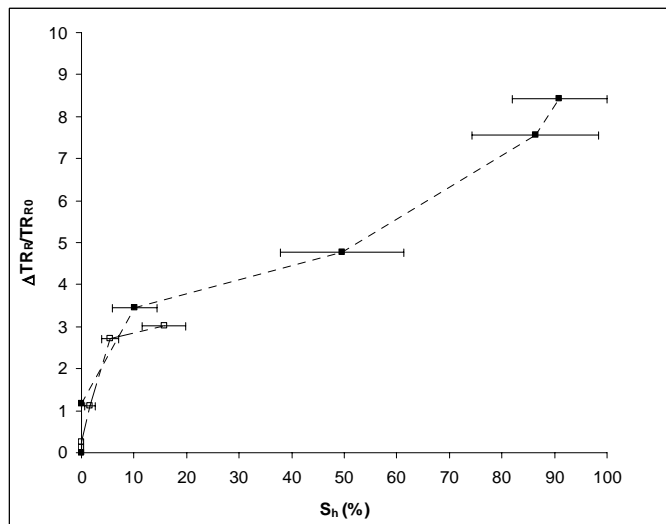


Fig. V.3.28. Incremento relativo de la tasa respiratoria vs superficie de heridas de infección en naranjas var Navelate inoculadas con esporas de *P. digitatum* (■) y *P. italicum* (□), almacenadas a 21°C y 75,5% HR, del lote 1.

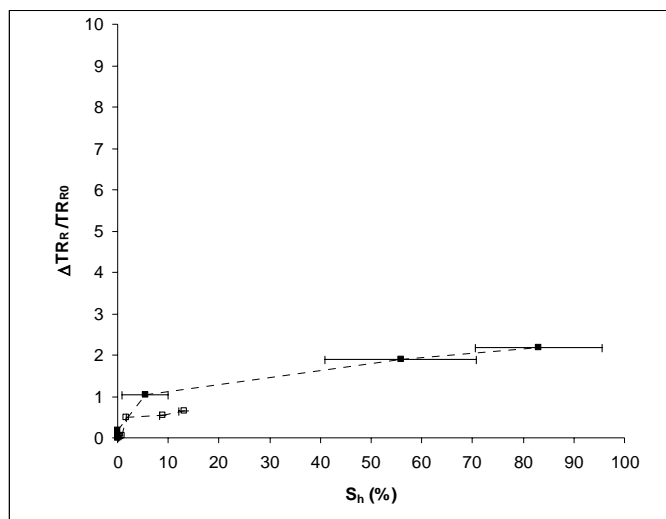


Fig. V.3.29. Incremento relativo de la tasa respiratoria vs superficie de heridas de infección en naranjas var Navelate inoculadas con esporas de *P. digitatum* (■) y *P. italicum* (□), almacenadas a 21°C y 85% HR, del lote 2.

Se observa que las tasas respiratorias aumentaron antes de detectarse superficie infectada en los 4 tratamientos, siendo el más notorio y agresivo el *P. digitatum* a 75,5% HR.

Al reproducirse las estructuras del hongo (micelio y esporas), con distinta velocidad dependiendo del tipo de microorganismo, las mismas se van acumulando en la superficie del fruto.

Como la aerobiosis en los frutos cítricos está condicionada por el buen funcionamiento de los estomas que regula el flujo de los gases (Kays, 1991), el poder cubriente del microorganismo podría ser la causante de la obturación de las vías apoplásticas por la contaminación superficial que provoca y por tanto del desarrollo de fermentación por parte del fruto infectado, con la consiguiente aparición de acetaldehído y etanol en el espacio de cabeza de las frutas inoculadas y de malos olores (Davis, 1973; Pesis y Marinansky, 1991; Norman y Craft, 1971; Pesis y Avissar, 1989).

Sin embargo, esta componente anaerobia resulta mucho menos importante que las otras componentes respiratorias determinada en el modelo.

Las elevadas tasas respiratorias calculadas con respecto a las tasas fermentativas sugieren que el aumento en la producción de CO₂ en las naranjas infectadas con esporas de *Penicillium* se deba a la interacción hongo-fruto, como han sugerido algunos autores (Schiffmann-Nadel, 1977; Zauberman y Barkai-Golan, 1975). El aumento en la producción de CO₂ en fruta infectada ocurre durante la esporulación, mientras que la producción de CO₂ "in vitro" durante esta etapa es relativamente baja (Pesis y Marinansky, 1991).

En resumen, se ha desarrollado un método analítico que permite segregar los flujos de CO₂ en función de su generación aerobia o anaerobia. Al mismo tiempo, mediante la comparativa mostrada en las anteriores gráficas se observa que controlando incrementos en la concentración de CO₂ en el espacio de cabeza es posible detectar avances infecciosos por mohos en cítricos.

V.4. CONCLUSIONES

- Se ha diseñado un sistema cerrado de análisis de tasas respiratorias en frutas frescas. El sistema permite el análisis automático y de forma prácticamente continua de la composición del espacio de cabeza de fruta almacenada en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa.
- Para la puesta a punto del sistema analítico se analizaron tasas respiratorias en naranjas recién recolectadas, confirmándose, con los resultados obtenidos, el buen ajuste de las variables implicadas en la experimentación.
- Se han analizado los cambios en la concentración de CO₂ en el espacio de cabeza de frutas inoculadas con microorganismos del género *Penicillium*. En ambos casos se detectan aumentos importantes en la emisión de gas, detectables ya al segundo día tras la inoculación.
- La concentración de CO₂ analizada varía con la especie inoculada. Así, *P. digitatum* es una especie más agresiva, obteniéndose mayores cambios en la tasas respiratoria. Los cambios en el espacio de cabeza de naranjas inoculadas con *P. italicum* son más moderados y se detectan con posterioridad.
- Los cambios, como consecuencia de la infección, en la tasa respiratoria, fueron mayores en naranjas de menor índice de madurez. La fruta con mayor índice de madurez presentaba ya, antes de la inoculación, un metabolismo acelerado, constatado en los análisis efectuados en la fruta control. Este hecho implicaría menores variaciones, fundamentalmente en los primeros días de análisis, en la concentración del espacio de cabeza.
- De forma general, a partir del tercer día postinoculación empiezan a aparecer los primeros síntomas de infección, más o menos intensos dependiendo de la especie de microorganismo. Los análisis de superficie

de infección muestran también la mayor agresividad del *P. digitatum* frente al *P. italicum*, desarrollándose con mayor velocidad.

- En todos los casos, existe un periodo de tiempo muy corto, donde es posible detectar, mediante análisis del espacio de cabeza, cambios importantes en la actividad metabólica, antes de que comiencen a visualizarse síntomas de infección.
- Con el sistema de análisis desarrollado es posible detectar otros componentes volátiles en el espacio de cabeza, como etanol y acetaldehído. Los cambios metabólicos en la fruta sometida a un estrés fúngico se traducen también en una emisión de estos volátiles. La detección de acetaldehído y etanol estaría indicando un cambio en las rutas metabólicas, desplazando la respiración hacia la vía fermentativa.
- El bajo rendimiento energético que se produce bajo condiciones anaeróbicas (mucho más glucosa debe ser oxidada para mantener el nivel energético que la célula necesita) implica aumentos importantes en la tasa respiratoria, lo que fue constatado a través del aumento en la producción de CO₂.
- Es de destacar, que la concentración de estos gases alcanza siempre un máximo (dependiente del tipo de infección y el índice de madurez de la fruta) para decrecer con el tiempo, mientras que la tasa de CO₂ continua aumentando. Probablemente, las bajas tasas de emisión de acetaldehído y etanol detectadas a partir de un determinado momento están relacionadas con la conversión del acetaldehído en etil acetato, compuesto de la vía fermentativa no analizado en este trabajo.
- Se ha desarrollado un modelo que pretende describir las componentes respiratorias que conformarían el aumento de la tasa respiratoria registrado en las frutas inoculadas, relacionando las variables del sistema naranja-entorno: CO₂ (total, respiratorio, fermentativo) y el poder cubriente del microorganismo inoculado. Con este modelo es posible, a

través de análisis de espacio de cabeza segregar los flujos de CO₂ en función de su generación aerobia o anaerobia.

- Según este modelo, en naranjas sometidas a un estrés fúngico, la componente fermentativa resulta prácticamente despreciable frente a las otras componentes respiratorias, lo que sugiere que el aumento en la producción de CO₂ en las naranjas infectadas con esporas de *Penicillium* se debe a la interacción hongo-fruto. Sin embargo, esta componente anaerobia resulta mucho menos importante que determinada en el modelo.

CAPITULO VI
RESPUESTA FISIOLÓGICA DE MANZANAS
SOMETIDAS A UN ESTRÉS MECÁNICO

VI.1. INTRODUCCIÓN

Durante el periodo de postcosecha existe un amplio espectro de situaciones de estrés o daños potenciales que pueden afectar a las frutas y hortalizas cosechadas.

Desde el punto de vista de la fisiología de postcosecha una situación de estrés está determinada por un factor externo (sucesión de factores) de tal magnitud que tiende a alterar los procesos fisiológicos normales de una planta o de una parte de una planta, por ejemplo, el fruto, si éste es expuesto a dicho factor durante suficiente tiempo y / o intensidad.

Un factor de estrés interrumpe, restringe o puede acelerar los procesos metabólicos normales y generalmente esto ocurre de una manera adversa o negativa que produce efectos no deseados en la calidad del producto. El alcance del daño está determinado por la severidad del factor de estrés actuante, el periodo de tiempo en que el producto está expuesto al mismo y de la resistencia constitutiva general del producto hacia el factor de estrés actuante (Kays, 1991).

Los factores de estrés que afectan a los vegetales pueden ser los siguientes: la temperatura, el agua, los gases, las radiaciones (luz visible y luz ultravioleta), los animales herbívoros, las fuerzas gravitacionales, los compuestos químicos, los impactos mecánicos y las afecciones patológicas.

Es de interés por lo tanto, intentar comprender no sólo el efecto de estos tipos de daños sobre el fruto y sus componentes de calidad sino también la respuesta del fruto hacia ese daño o factor de estrés.

Las frutas y hortalizas varían ampliamente en su susceptibilidad a ser dañadas mecánicamente y respecto al tipo de lesión mecánica que tienden a sufrir. Se ha demostrado que los daños mecánicos están correlacionados con cambios metabólicos y cambios en la calidad en frutas y hortalizas tales como el tomate, el boniato, cítricos y melones. Así, el ácido cítrico y málico aumentan transitoriamente en los tomates tras sufrir una magulladura por vibración

(Nakamura *et al.*, 1977). Los boniatos muestran un aumento del 72% en la tasa respiratoria tras de sufrir un impacto físico (Saltveit y Locy, 1982).

VI.1.1. DAÑOS MECÁNICOS EN POSTCOSECHA

VI.1.1.1. Origen de los daños

Frecuentemente las condiciones del diseño de las líneas de confección y los procesos a los que se someten los frutos durante su paso por las mismas pueden provocar alteraciones en la calidad de los frutos que se manifiestan de inmediato o durante su vida comercial.

Las lesiones por impacto provocadas durante la manipulación pueden ser por cuatro tipos de lesión mecánica: cortes, impactos, compresiones y vibraciones, siendo los tres últimos muchas veces difíciles de detectar por observación visual. En la Tabla VI.1.1. se recoge la susceptibilidad aproximada de algunas frutas a las lesiones por compresión, impacto y vibración.

Tabla VI.1.1. Susceptibilidad de las frutas a diversos tipos de lesiones mecánicas: susceptible (S); resistente (R); intermedio (I). (Fuente: Wills *et al.*, 1984).

Fruta	Tipos de Lesión		
	Compresión	Impacto	Vibración
Manzana	S	S	I
Albaricoque	I	I	S
Plátano, verde	I	I	S
Plátano, maduro	S	S	S
Melón	S	I	I
Uva	R	I	S
Melocotón	S	S	S
Pera	R	I	S
Ciruela	R	R	S
Fresa	S	I	R
Calabaza de verano	I	S	S
Tomate, verde	S	I	I
Tomate, maduro	S	S	I

Las lesiones por impacto se producen por la aplicación brusca de una fuerza sobre las frutas y hortalizas, por ejemplo, si se dejan caer los envases, o a consecuencia de los choques que puedan tener lugar durante el transporte de los productos.

Las vibraciones comunes durante el transporte generan abrasiones que varían en intensidad desde simples señales de frotamiento hasta la pérdida no solo de trozos de piel sino incluso de la porción carnosa de la fruta. Todas estas lesiones adquieren una coloración parda por oxidación de los taninos y por exposición al aire de productos similares en los tejidos dañados. El producto queda así desfigurado y su valor comercial reducido. Estas lesiones incrementan la susceptibilidad a enfermedades pues constituyen vías abiertas a la infección, colaboran en las pérdidas de agua, incrementan la actividad respiratoria y por tanto la velocidad de deterioro, causando pérdidas de producto comestible, en cuanto que es preciso desechar la porción dañada (Wills *et al.*, 1984).

Aspectos como la turgencia y la firmeza de los frutos así como la temperatura de trabajo pueden influir notablemente en la incidencia y manifestación de los daños. En muchos casos, estas fuerzas exceden el límite elástico del producto y acarrearán un daño irreversible para el mismo.

Las pérdidas debidas a impactos mecánicos en postcosecha pueden ser de considerable gravedad, siendo que a nivel internacional, el daño mecánico se le considera como el mayor causante de pérdidas postcosecha (FAO, 1989).

A modo de ejemplo, si se analizan las pérdidas en ventas muestreadas, ya sea a nivel comercial al por mayor y también a nivel de ventas a consumidores, debidas a daños mecánicos del sector de frutas y hortalizas del área de mercadeo de New York, las mismas representaron entre el 0,2% hasta más del 8% de los productos (Tabla VI.1.2.) (Kays, 1991).

Durante la misma recolección se producen daños mecánicos en los frutos los cuales son eliminados posteriormente en el almacén al realizar las

correspondientes selecciones. Sin embargo en el almacén pueden producirse también una gran cantidad de daños.

Todas estas razones hacen necesario aumentar la comprensión de los factores tanto físicos como fisiológicos relacionados que permitan mejorar los sistemas de manipulación de los frutos.

Tabla VI.1.2. Pérdidas de postcosecha de frutas y hortalizas muestreadas en el área de comercio y venta de la zona de mercadeo de New York. (Fuente: Kays, 1991).

Fruta	Daño Mecánico %	Enfermedades Parasitarias %	Desórdenes No Parasitarios %
Manzanas "Red Delicious" *	1,8	0,5	1,3
Pepinos	1,2	3,3	3,4
Uvas "Emperor"	4,2	0,4	0,9
Uvas "Thompson"	8,3	0,6	1,6
Lechugas, "Iceberg"	5,8	2,7	3,2
Naranjas "Navel"	0,8	3,1	0,3
Naranjas "Valencia"	0,2	2,6	0,4
Melocotones	6,4	6,2	–
Peras "Bartlett"	2,1	3,1	0,7
Peras "Bosc"	4,1	3,8	2,2
Peras "d'Ánjou"	1,6	1,7	0,8
Pimientos "Bell"	2,2	4,0	4,4
Patatas "Katadhin" #	2,5	1,4	1,0
Patatas "White Rose" #	1,5	2,4	0,4
Fresas	7,7	15,2	–
Boñatos	1,7	9,2	4,2

* Pérdidas a nivel de venta al por mayor

Pérdidas a nivel de ventas a consumidores

Los sistemas de calidad que operan en la mayoría de los procedimientos de manipulado de postcosecha especifican una tolerancia de daños que no debe ser superada. Por ejemplo: “La contusión no debe exceder 1 cm² de superficie” (Bollen *et al.*, 2001). Este criterio es difícil de interpretar respecto a la relación fuerza/contusión, ya que la susceptibilidad del fruto a los impactos está influenciada por numerosos factores tales como la exposición solar, posición en el árbol, tamaño de la fruta, variedad y maduración. La variabilidad de estos factores determinará la variabilidad de la susceptibilidad del fruto a los impactos.

Muchos estudios relacionados tienen como objetivo predecir la probabilidad de estos daños y determinar los umbrales de impacto.

Respecto a los puntos críticos de la manipulación (Hasegawa *et al.*, 1989) trabajando con Satsumas determinaron que los principales daños se producen en la recepción de las cajas de campo, en el cepillado, en el calibrado, por el transporte interno en el almacén y cuando se pesan y empaacan los frutos.

Zhang (1994) determinó que el rango umbral de impacto en manzanas se situaba entre 6 y 22 mm sobre superficies rígidas. Schulte *et al.* (1992) demostró que el umbral de impacto sobre superficies almohadilladas puede ser de hasta 320 mm.

En productos agrícolas, históricamente, los impactos se han considerado desde bajas velocidades de aproximación de 250 mm s⁻¹, considerados como daños de bajo impacto hasta de altas velocidades de aproximación de 40 m s⁻¹ considerados de alto impacto. Durante el manejo de frutas y vegetales la mayoría de los impactos ocurren en el rango de valores altos de velocidad, pero es frecuente que las contusiones o magulladuras aparezcan a una altura de caída menor de 3,2mm (Bajema y Hyde, 1998).

VI.1.1.2. Consecuencias de los daños

Como consecuencia de los daños, se provocan alteraciones que pueden ser visibles exteriormente en forma de manchados superficiales por ruptura de

las células superficiales de la piel y posterior quemado por los aceites o bien manifestarse como reblandecimientos, zonas hundidas, deformaciones, etc. (Del Río *et al.*, 2000).

Los manchados superficiales de las frutas ocurren como consecuencia de un impacto mecánico suficientemente alto como para causar la mezcla de sustrato y enzima que hace que se produzca la decoloración oscura (pardeamiento enzimático).

El pardeamiento enzimático se debe a la oxidación de los compuestos fenólicos de las frutas. La enzima responsable, la polifenoloxidasas, se localiza en los cloroplastos y mitocondrias, ya sea unida a las membranas tilacoidales de los cloroplastos o en forma soluble. Para que este fenómeno tenga lugar se requiere de la presencia de cuatro diferentes compuestos: el oxígeno molecular, sustratos apropiados, la polifenoloxidasas y la presencia de cobre en el centro activo de la enzima. Estos factores determinan la velocidad de pardeamiento, que puede tener lugar muy rápidamente, incluso en 30 minutos (Laurila *et al.*, 1998). La velocidad de pardeamiento dependerá de factores tales como la concentración y la actividad de la enzima, la cantidad y naturaleza de los compuestos fenólicos, pH, temperatura, actividad del agua y de la cantidad de oxígeno disponible en el entorno del tejido vegetal (Mayer, 1987). Otros factores intrínsecos que influyen en la intensidad del pardeamiento son: la especie, la variedad y el estado fisiológico de los frutos (Amiot *et al.*, 1992).

Como sustratos de la reacción sirven los numerosos compuestos fenólicos existentes en las frutas, como el ácido clorogénico, las catequinas, las leucoantocianidinas, las antocianinas y flavonoides, siendo el primero de ellos el sustrato principal del pardeamiento enzimático en las frutas (Primo Yúfera, 1997).

Las fases de la transformación son las siguientes: compuesto fenólico que mediante una hidroxilación (enzimática) se transforma en un o-fenol (incoloro) que luego se oxida dando una o-quinona (coloreada), que luego se polimeriza

dando un compuesto coloreado. La hidroxilación y la oxidación de los fenoles son reacciones separadas catalizadas por la polifenol oxidasa.

Dicho proceso se hace patente, de forma inmediata, cuando las frutas son peladas, cortadas o trituradas y sus tejidos se exponen en contacto con el oxígeno del aire. A él se deben también las coloraciones pardas que aparecen en la fruta fresca, como consecuencia de golpes o daños fisiológicos ocasionados en su almacenamiento.

Generalmente en los lugares afectados por los impactos aparecen magulladuras, originadas por la rotura celular de los tejidos. Éstas, con aspecto más oscuro y blando, diferenciado del resto del fruto, provocarán notables reducciones en el valor comercial del producto.

La interpretación de la función que puedan tener la polifenol oxidasa y el oscurecimiento en la fisiología vegetal es variada. Cheftel y Cheftel (1976) afirman que las reacciones de pardeamiento enzimático poseen un papel de protección contra microorganismos, pues se considera que los polímeros coloreados que se forman cuando un tejido se lesiona, pueden constituir una defensa contra la penetración de microorganismos, o incluso retrasar su proliferación. Valero-Ruíz (1993) considera que la participación de la polifenol oxidasa en procesos fisiológicos tan diversos como la biosíntesis de ligninas, la esclerotización de la cutícula de artrópodos y la biosíntesis de melaninas se debe a la gran variedad de posibles sustratos y a la elevada reactividad de las o-quinonas, productos primarios de reacción generados por la actividad de esta enzima.

Globalmente las consecuencias de los impactos mecánicos sobre los frutos suelen ser desde el punto de vista físico como por ej.: La pérdida de parte del producto; fisiológico (pérdida de peso causada por el incremento en las pérdidas de agua y por incrementos en la respiración); patológico (facilitan la entrada a microorganismos) o cualitativo (aparición de manchas oscuras, ablandamientos, roturas, etc.) que influyen negativamente en el aspecto del producto.

Además, los impactos mecánicos influyen sobre la fisiología del fruto, incrementando la intensidad respiratoria y la producción de etileno, situación que puede constituir una buena vía de entrada de los agentes causantes del podrido, conduciendo de esta manera al producto a una situación de deterioro importante de la calidad y del sabor.

Boehm (1987) demostró que el corte en patatas resultaba en una tasa de producción anormal de CO₂. El corte de raíces y la colecta de hojas en árboles resulta en aumentos de la respiración (Kays, 1991).

Los daños mecánicos muchas veces facilitan la difusión de gases dando como resultado un sustancial pero transitorio aumento en la respiración aparente debido al escape de CO₂ acumulado en el espacio intercelular del tejido vegetal. Como consecuencia de ello, muchas veces es difícil realizar una clara distinción entre una difusión facilitada o los efectos del golpe en la respiración cuando lo único que se mide en este sentido es la producción de CO₂ (Kays, 1991).

Uritani y Asahi (1980) caracterizaron las diferencias de respuestas respiratorias entre tejidos vegetales dañados por impactos mecánicos y tejidos vegetales dañados por infecciones fúngicas, exponiendo 2 patrones diferentes. En ambos casos, los aumentos en la respiración coincidieron con el aumento del catabolismo de carbohidratos almacenados y con un aumento de los azúcares solubles en algunos tejidos. Tanto la ruta glicolítica como la ruta pentosa fosfato resultaron estimuladas en respuesta a la demanda incrementada de los productos metabólicos vegetales primarios y secundarios necesarios para reaccionar y / o reparar el daño.

Los aumentos respiratorios en respuesta al daño mecánico están relacionados con el proceso de curación, específicamente de la cicatrización, que incluye la formación de lignina, suberina y en algunos casos, de *callus*. El aumento en la respiración facilita la posibilidad de un mayor aporte de precursores y cofactores requeridos para la biosíntesis de estas capas curativas del daño, proveyendo de la energía necesaria para dichos procesos.

Los aumentos respiratorios en respuesta al daño causado por una infección están relacionados con las reacciones de defensa de primer y segundo tipo. Las plantas han desarrollado varias técnicas para combatir la invasión de microorganismos. Por ejemplo, la muerte rápida de células dando como resultado zonas necróticas, limita el micelio del hongo, limitando el número de células infectadas. Así mismo, productos secundarios como las fitoalexinas pueden formarse para minimizar la invasión. Estos procesos, como los que ocurren frente al daño mecánico, necesitan de aporte energético que lo provee la respiración, lo que causa un aumento respiratorio del tejido.

VI.1.1.3. Métodos de evaluación de daños mecánicos en frutas y hortalizas

Uno de los métodos cuantitativos que existen para evaluar el daño mecánico es la medida de la tasa respiratoria en tejidos dañados de frutas y hortalizas.

Un método utilizado para dicha medida es el análisis de gases por rayos infrarrojos (IRGA), que implica pasar el gas de salida del tejido vegetal analizado por una unidad de IRGA. El sistema puede ajustarse para obtener un registro continuo de la emisión de CO₂ frente al tiempo. En patatas dulces se ha constatado el incremento en las tasas respiratorias en respuesta a daño mecánico (Mohnsenin, 1981).

Otro método utilizado en la medida de la tasa respiratoria de frutas dañadas mecánicamente es la cromatografía de gases, por análisis del espacio de cabeza (Del Río, 2000).

La evaluación de los daños sobre el fruto se ha centrado principalmente en la medida de las propiedades reológicas de los frutos. La reología, el estudio de la deformación y el flujo de la materia, se ha aplicado extensivamente en frutas y hortalizas en un esfuerzo por comprender la relación entre la estructura, textura y los cambios inducidos por el procesado.

Las propiedades mecánicas de las hortalizas y frutas se han estudiado ampliamente utilizando métodos de ensayo desarrollados para materiales no

biológicos. Este enfoque puede producir una comprensión muy útil del comportamiento mecánico de los alimentos en ciertas circunstancias, pero existen ciertas desventajas cuando se utilizan estos métodos para medir la textura de los alimentos. Esto se relaciona principalmente con el hecho de que las percepciones humanas de la textura de los alimentos están basadas en nuestro propio aparato de ensayo mecánico, la boca, que no siempre trabaja de la misma forma que los métodos que están exactamente paralelizados para realizar los ensayos en ciencia clásica de materiales.

Muchas técnicas utilizadas son destructivas, pero existe un interés creciente en la utilización de técnicas no destructivas.

Ensayos destructivos:

Los métodos e instrumentos utilizados en los ensayos destructivos más importantes son (Rosenthal, 2001):

Penetrómetros: a los cuales también se denomina como medidores de presión se han utilizado ampliamente para medir la textura de manzanas, melocotones y cerezas. Los cultivadores de plantas originariamente utilizaron el ensayo para evaluar la madurez de frutas y hortalizas. Posteriormente, el método se usa comúnmente para evaluar la fuerza de la piel.

Ensayos de extrusión: La muestra sometida a este tipo de ensayo va siendo empujada a través de un enrejado de alambres gruesos en el fondo de la celda de ensayo.

Análisis de perfiles de textura: El perfil de la textura primeramente fue desarrollado por la General Foods Corporation y combina las medidas de cierto número de parámetros. La muestra se comprime dos veces y el análisis de la curva fuerza-tiempo producida da las figuras de dureza, cohesividad, elasticidad, adhesividad, fracturabilidad, masticabilidad y gomosidad.

Métodos de ensayo no destructivos:

Los métodos de ensayo no destructivos más utilizados son:

Ensayos de compresión por debajo del punto de ruptura de la piel: Estos ensayos han sido más ampliamente informados para materiales de hortalizas y frutas que los ensayos de tensión, posiblemente debido a la mayor facilidad de llevarlos a cabo.

Para intentar determinar cuales son las máximas cargas estáticas y dinámicas que las manzanas pueden soportar en la manipulación postcosecha y almacenamiento, Mohsenin y colaboradores (1981) introdujeron y aplicaron el concepto de presión del punto de ruptura de la piel de las frutas como método no destructivo de la evaluación de la firmeza de la fruta antes y después de la cosecha, demostrando la importancia del manejo cuidadoso que se debe realizar al aplicar fuerzas de compresión sobre frutas.

Estos autores llevaron a cabo varios ensayos de compresión con manzanas cuya piel estaba intacta, estudiándose las curvas fuerza/deformación. Según Moshenin (1981) y colaboradores la primera quiebra en la curva fuerza/deformación indica que ha ocurrido una fractura inicial en la estructura celular de la fruta que iniciará el pardeamiento y la decoloración. Este punto de fractura en la curva se denominó punto de ruptura de la piel. La superficie de presión (fuerza por unidad de área) correspondiente a dicho punto de ruptura puede referirse como la presión de ruptura para dicha fruta en ese momento de su desarrollo.

Mientras ningún punto de ruptura se observe en una curva fuerza/deformación de una fruta frente a un ensayo de compresión, ningún pardeamiento o decoloración es detectado generalmente si se realiza un corte en la región de la muestra analizada. Si la compresión continua sobrepasando el punto de ruptura, entonces se alcanzará al punto de penetración en el cual el punzón rompe la piel y súbitamente se observa una reducción de la fuerza. Utilizando la terminología utilizada en el análisis de materiales de construcción, la pendiente de la porción recta de la curva brindará una indicación de la rigidez. El área por debajo de la curva hasta alcanzar el punto de ruptura representa el trabajo requerido para causar la ruptura inicial de células (Moshenin, 1981).

Relación de Poisson: Cuando un material es extendido, normalmente le ocurren dos cosas: se alarga en dirección transversal pero también se contrae en la dirección perpendicular (axial). La relación de Poisson se define como el valor absoluto de la relación de la deformación transversal respecto de la correspondiente deformación axial. En materiales provenientes de hortalizas y frutas, el tejido raramente es isotrópico, de tal modo que la relación de Poisson tendrá más de un valor, dependiendo de la orientación. El valor de la relación de Poisson está influenciado por la estructura del tejido (Chappell y Hamann ,1968).

Comportamiento viscoelástico: Morrow y Mohsenin (1966) estudiaron las frutas como materiales viscoelásticos, sugiriendo que las muestras con un alto contenido en agua se comportan muy similarmente a los modelos mecánicos utilizados para representarlos. Las células se comportan de manera casi elástica y los fluidos celulares representan el elemento viscoso del modelo.

Otros métodos no destructivos: Finney (1971) utilizó una técnica de resonancia sónica para generar un índice de firmeza no destructivo en manzanas. Baedemaker y Wounters (1987) utilizaron un modelo similar en cilindros extirpados de tejido de manzana así como en manzanas enteras.

VI.2. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.2.1. MATERIA PRIMA

La materia prima utilizada en esta parte del trabajo consistió en manzanas de la variedad Granny Smith.

Dado que en el período de tiempo en que se desarrollaron los ensayos no fue posible conseguir manzanas cosechadas directamente del árbol para garantizar que no tuvieran ningún golpe previo a realizar los impactos, las frutas se compraron siempre en un mismo establecimiento, procurando elegir aquellas que no presentaran magulladuras, manchas, contusiones o zonas hundidas y siempre empaquetadas en la misma fecha, ante la imposibilidad de conocer la fecha de recolección. Las manzanas provenían de Francia.

Posteriormente, en el laboratorio se realizaba una segunda selección que permitiera identificar claramente aquellas que no presentaban manchas de golpes en su superficie o magulladuras que no fueron advertidas en el momento de la compra.

VI.2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Cada una de las manzanas fue pesada por triplicado, antes de efectuarles el golpe. Posteriormente se les marcó dos círculos diametralmente opuestos en la zona ecuatorial donde se pretendían realizar los impactos midiéndose sus diámetros (Ragni *et al*, 2001).

Se ajustó la altura de la plataforma del péndulo para que la esfera impactante golpeará exactamente en el centro de la zona marcada y se procedió a realizar el impacto según el ángulo deseado.

A continuación, se conservaron las muestras a una temperatura de 4 °C (Álvarez, 1998; Prothon *et al.*, 2001) en una cámara frigorífica marca Misa para su conservación en condiciones similares a las de su almacenamiento

comercial hasta el momento en que fueran necesarias para los análisis, momento en que se extraían con tiempo suficiente como para que se equilibraran con la temperatura ambiente.

Se trabajó con un total de 70 manzanas Granny Smith. Los ensayos para calcular las tasas respiratorias se realizaron por duplicado sobre 12 manzanas. El resto de los ensayos se realizaron por triplicado. En la Fig. VI.2.1. se muestra un esquema del plan de trabajo realizado.

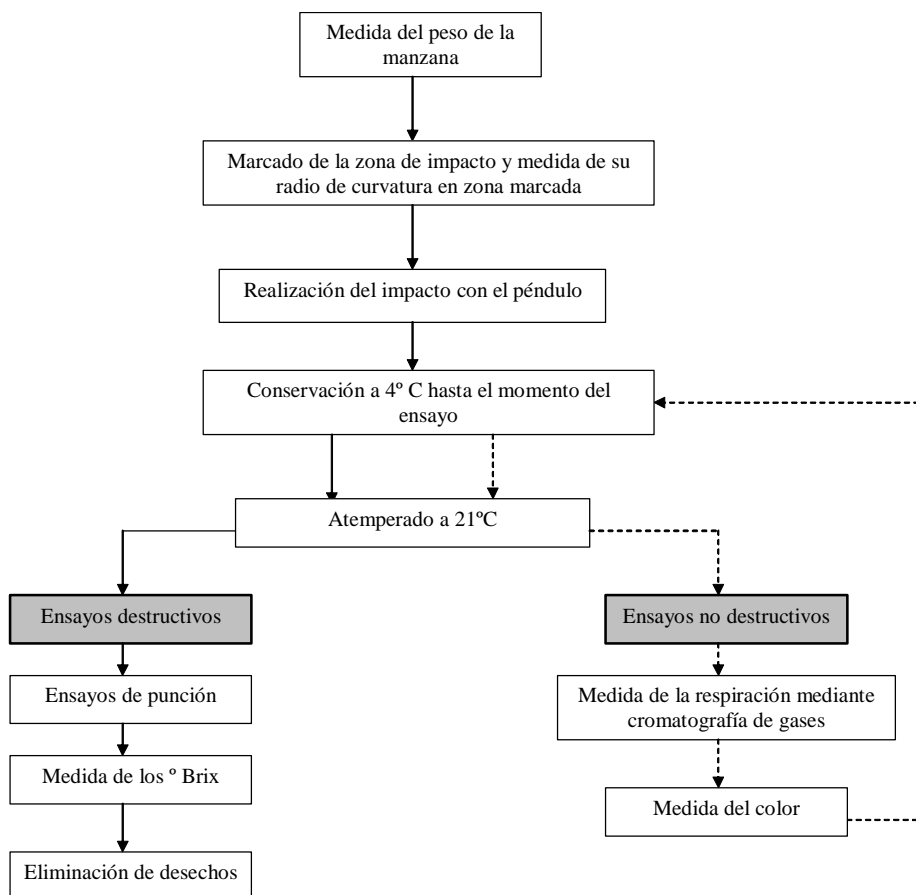


Fig. VI.2.1. Secuencia de pasos realizada durante los ensayos.

VI.2.3. IMPACTOS

Se realizaron los impactos a la fruta por medio de un péndulo diseñado en un trabajo previo por Aunión (2002), con el cual se pudieron ejecutar los golpes a las manzanas en un lugar y con fuerzas determinadas, ya que la fruta se sitúa sobre una plataforma permitiendo que la altura y posición sean ajustables, de manera que se pueda elegir exactamente el lugar del impacto.

La fuerza del impacto se calculó a través del ángulo de giro del péndulo y mediante la fórmula de impacto entre dos esferas de Timoshenko y Goodier (1951).

El péndulo utilizado, de latón comercial, dispone de un indicador que permite graduar la intensidad del golpe constituido por un sector graduado en grados sexagesimales, alrededor de cuyo centro puede pivotar el péndulo, lo que permite conocer la velocidad de aproximación de la masa pendular en el momento del impacto.

La figura VI.2.2. muestra la manera de realizar los impactos en las frutas con el sistema construido.

Las características constructivas del péndulo (Aunión, 2002) permiten lograr impactos equivalentes a alturas de caída libre sobre superficies rígidas como las que muchas veces se producen en almacenes de confección de frutas, desde 3,2mm hasta 350mm aproximadamente (Bajema y Hide, 1998; Bajema *et al.*, 2000; Ortiz-Cañavate *et al.*, 2001; Menesatti y Paglia, 2001; Bajema *et al.*, 1998)

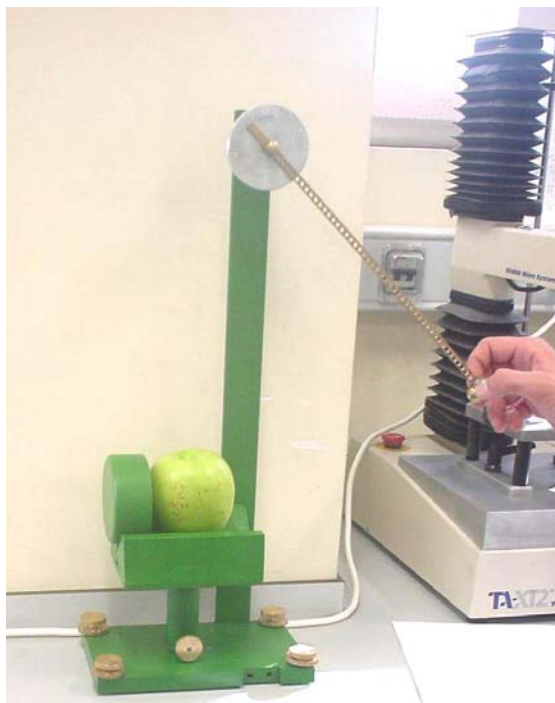


Fig. VI.2.2. Realización de los impactos en manzanas Granny Smith con el péndulo diseñado por Aunión (2002).

VI.2.4. ANÁLISIS NO DESTRUCTIVOS

VI.2.4.1. Evaluación de la tasa respiratoria

Para el análisis de la actividad respiratoria del fruto se utilizó el sistema de análisis de tipo estático explicado en el punto V.2.4. de Materiales y Métodos del Capítulo V, aplicándose el modelo matemático propuesto en el punto V.3.2. de Resultados y Discusión del Capítulo V.

VI.2.4.2. Parámetros de color

Las medidas de color de las muestras se realizaron por reflexión de la superficie cubierta con vidrio óptico, con un espectrocolorímetro (Modelo CM-1000 Minolta Camera CO. LTD Japón), por triplicado sobre la zona afectada

por el impacto, previa calibración, utilizando como sistema de referencia el iluminante D⁶⁵/observador 10°.

Se obtuvieron las coordenadas rectangulares CIE-L*, a*, b* a partir del espectro de reflexión de las muestras. En este espacio de color la luminosidad viene representada por L* (0, negro; 100, blanco), atributo según el cual una superficie parece emitir más o menos luz; y la cromaticidad por los valores a* y b*, donde a* indica la proporción de componente rojo (+) y verde (-) y b* la proporción de componente amarillo (+) y azul (-), en el color medido (Chiralt *et al.*, 2000).

A partir de las coordenadas L*, a*, b* se estimaron las coordenadas cilíndricas:

- tono (h*_{ab}), atributo que ha suscitado nombres como azul, verde, amarillo, rojo, etc. Numéricamente es una medida angular, corresponde al ángulo de matiz que varía entre 0° y 360°, indicando la propia cualidad del color al brindar una idea aproximada del color al que se parece el estímulo percibido del objeto iluminado, donde 0° (o 360°) indica coloraciones rojo-púrpura, 90° amarillas, 180° verdes y 270° azules (Ec. VI.2.1.):

$$h^*_{ab} = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{VI.2.1.})$$

- croma (c*_{ab}), indica la intensidad o saturación del color, atributo que permite estimar la proporción de color cromático puro contenido en la sensación total. Numéricamente corresponde a la distancia desde el centro de la esfera de color al punto en cuestión (Ec. VI.2.2.).

$$c^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{VI.2.2.})$$

Asimismo, se calculó el parámetro ΔE que representa las diferencias de color entre la muestra previa al golpe (control) y las distintas muestras tomadas

tras recibir los impactos mecánicos a lo largo del tiempo de almacenamiento (7 días a 4°C), mediante la Ec. VI.2.3. (Hutchings, 1999).

$$\Delta E = \sqrt{(L_i - L_0)^2 + (a * _i - a * _0)^2 + (b * _i - b * _0)^2} \quad (\text{VI.2.3.})$$

VI.2.5. ANÁLISIS DESTRUCTIVOS

VI.2.5.1. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las muestras se caracterizaron mediante ensayos de punción por medio de un texturómetro para evitar al máximo la variabilidad en la respuesta. La prensa utilizada fue un texturómetro Stable Micro System modelo TA-TX” versión 3.7 H, conectado a un ordenador que contiene su respectivo paquete informático. Los ensayos se realizaron con un punzón cilíndrico (émbolo) de 6 mm de diámetro a una velocidad de aproximación de 2 mms⁻¹ y una velocidad de penetración de 3,3 mms⁻¹, introduciéndose en la muestra hasta una distancia de 10 mm. Se eligió una velocidad de penetración (compresión) rápida para minimizar al máximo posible el daño que la realización del propio ensayo conlleva a las muestras y un émbolo mediano para que el dato de compresión sea homogéneo (Fig. VI.2.3.).



Fig. VI.2.3. Texturómetro Stable Micro System modelo “TA TX” versión 3.7 H.

Al realizarse los ensayos sobre manzanas enteras, se utilizó un anillo de plastelina para poder mantener la zona a analizar en una posición perpendicular respecto del punzón y evitar así que el movimiento de la manzana afectara al ensayo, procurando siempre que la manzana mantuviera un punto de contacto con la superficie de apoyo opuesto diametralmente al punto de análisis (Fig. VI.2.4.).

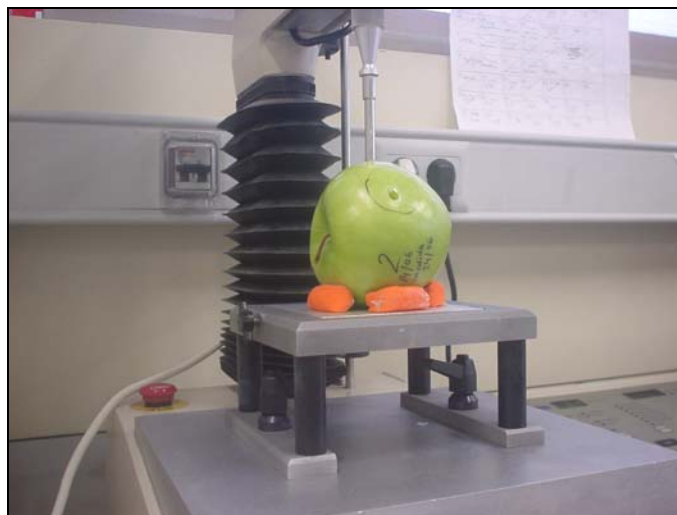


Fig. VI.2.4. Detalle de uno de los ensayos de punción realizado.

Las curvas fuerza - distancia obtenidas en los ensayos de punción fueron caracterizadas a través de 6 parámetros:

- Fuerza y deformación límites en el primer tramo lineal (F_L y d_L).
- Pendiente en el primer tramo lineal (E_L).
- Fuerza máxima (F_{max}) y deformación máxima (d_{max}).
- El cociente entre ambos (F_{max}/d_{max}) denominado como punto de ruptura/corte de la textura.

VI.2.5.2. Contenido en sólidos solubles

El valor de la concentración de sólidos solubles totales de un fruto está estrechamente ligado a su estado de madurez y en especial a su calidad. Están compuestos por azúcares, ácidos, sales y demás compuestos solubles en agua presentes en los jugos de las células de una fruta (Agustí, 2004).

La determinación de los °Brix se realizó inmediatamente después de los ensayos de punción. Se desprendió de la piel a las manzanas y se cortó la

zona ecuatorial de las mismas, zona donde se aplicaban los golpes y el ensayo de punción. De esta zona se tomaron porciones de dimensiones constantes de las zonas afectadas por los golpes y de zonas no afectadas para realizar las medidas por separado. Se licuaron las muestras mediante una Ultra Turrax modelo T25.

Una vez homogeneizada la suspensión se procedió a tomar unas gotas del zumo obtenido y se colocaron en el prisma del refractómetro ABBE (ATAGO modelo 3T, sensibilidad 0,01 Brix) con control de temperatura.

VI.2.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico Statgraphics® Plus en su versión 4.1 para *Windows* realizando estudios de análisis de la varianza (ANOVA).

VI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.3.1 DETERMINACIÓN DE LAS FUERZAS DE IMPACTO

El impacto de la masa pendular utilizada sobre la fruta puede modelizarse como el impacto de una esfera rígida sobre una esfera elástica. En este tipo de impacto, la respuesta dinámica al impactante es función de las masas, módulo de elasticidad, relación de Poisson, radio de curvaturas y la velocidad de aproximación relativa entre los dos objetos. En base al análisis teórico de Timoshenko y Goodier (1951) sobre dos esferas impactando, la magnitud de la fuerza máxima, F (N), actuando sobre ambos cuerpos puede ser expresada según la Ec. VI.3.1.:

$$F = \left(\frac{5 v^2}{4 n_1} \right)^{\frac{3}{5}} n^{\frac{2}{5}} \quad (\text{VI.3.1.})$$

siendo:

v : velocidad relativa de aproximación de las esferas (m s^{-1})

n_1 : relación de las masas de choque (Ec. VI.3.2.) (m_1 , masa del impactante (kg) y m_2 , masa de la fruta (kg)).

$$n_1 = \frac{m_1 + m_2}{m_1 m_2} \quad (\text{VI.3.2.})$$

como en nuestro caso, la manzana se encuentra fijada a la base del sistema, la masa impactante le transmite toda su energía, pudiéndose considerar a la fruta como un cuerpo de masa infinita. Por tanto la relación de masas de choque vendría dada por la ecuación VI.3.3.:

$$n_1 \cong \frac{1}{m_1} \quad (\text{V.3.3.})$$

n: una función dependiente del radio del impactante (R_1 en m), radio de curvatura de la fruta (R_2 , en m), la relación de Poisson (μ) y del módulo de elasticidad de la fruta (E), ambos valores obtenidos de la bibliografía (Ec. VI.3.4.).

$$n = \frac{4}{3} \frac{E}{(1-\mu^2)} \left[\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{VI.3.4.})$$

La velocidad relativa de aproximación de las esferas puede calcularse efectuando un balance de energía en el sistema. Así, la energía de la masa impactante antes de soltar el péndulo es toda de tipo potencial, transformándose toda en energía cinética en el momento del impacto (Ec VI.3.5.):

$$m_1 \cdot g \cdot h = \frac{1}{2} \cdot m_1 \cdot v^2 \quad (\text{VI.3.5.})$$

La velocidad relativa de aproximación v (m s^{-1}) queda pues, en función de h (altura de la masa impactante) (Ec. VI.3.6.):

$$v = \sqrt{2 \cdot g \cdot h} \quad (\text{VI.3.6.})$$

La altura de la masa impactante (h) (Ec. VI.3.7.) puede calcularse en función del ángulo de impacto (α) y el radio de giro (R_G) del péndulo (Fig. VI.3.1.):

$$h = R_G - R_G \cos \alpha \quad (\text{VI.3.7.})$$

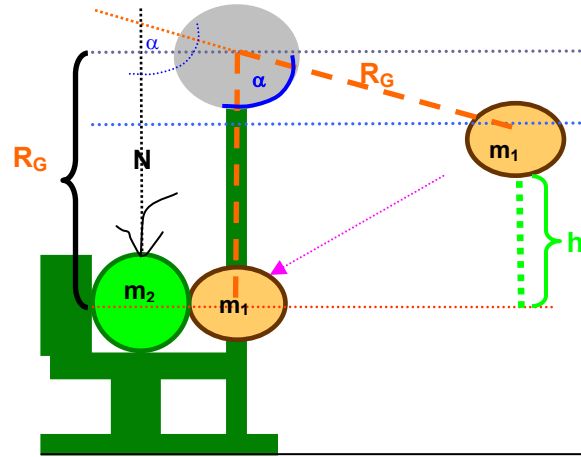


Fig. VI.3.1. Variables a considerar en el péndulo.

Sustituyendo h en la Ec. VI.3.6. puede calcularse la velocidad relativa de aproximación de las esferas conocido el ángulo de impacto (Ec. VI.3.8.):

$$v = \sqrt{2 \cdot g \cdot R_G \cdot (1 - \cos \alpha)} \quad (\text{VI.3.8.})$$

Una vez obtenida la velocidad correspondiente a cada ángulo de impacto aplicado a las frutas, se calculó la fuerza de impacto correspondiente, según la ecuación de Timoshenko y Goodier (1951) (Ec. VI.3.1.). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI.3.1.

Para ello, cada una de las frutas a golpear con un determinado ángulo de impacto fue caracterizada, considerando su peso (m_2) así como su radio de curvatura (R_2). Además, se consideraron los siguientes parámetros constantes:

- características del sistema pendular (Aunión, 2002):
 - masa del impactante (m_1): 0,07171 kg
 - radio de curvatura de la masa impactante (R_1): 0,01 m
 - radio de giro (R_G): 0,229 m
- características intrínsecas a la fruta (Chen y Ruiz-Altisent, 1993):

- módulo de Poisson (μ): 0,49
- módulo de elasticidad (E): 7,0 MPa

Como puede observarse, la correlación entre el ángulo de impacto aplicado y la fuerza de impacto correspondiente es alta, lo que evidencia la similitud en cuanto a masa y tamaño de la materia prima utilizada.

Tabla VI.3.1. Fuerzas medias (N) percibidas por las manzanas agrupadas en un mismo ángulo.

ANGULO (°)	FUERZA MEDIA (N)
0	0,000 ± 0,000
50	0,249 ± 0,005
60	0,305 ± 0,002
70	0,360 ± 0,004
80	0,414 ± 0,004
90	0,462 ± 0,008
100	0,510 ± 0,008
110	0,554 ± 0,006

Para el análisis de la influencia que la intensidad de la fuerza de impacto puede ejercer sobre los distintos parámetros fisiológicos analizados en este trabajo, las frutas se agruparon en distintos intervalos de fuerza aplicados, correspondientes a 7 ángulos medidos en la escala angular del equipo (50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100° y 110°).

Para ello, se realizaron intervalos de fuerza, calculando primero el intervalo de fuerza genérico como la diferencia entre el mayor (0,561 N) y el menor impacto (0,241 N) obtenidos en todo el estudio, dividido por el número de interceptos (6), originando así 7 intervalos con una diferencia entre ellos de 0,053 N.

En la Tabla VI.3.2 se muestra la nomenclatura utilizada para cada uno de los grupos de manzanas con su correspondiente valor de fuerza de impacto aplicada, nomenclatura que será utilizada a lo largo de todo este estudio.

Tabla VI.3.2. Nomenclatura de los grupos de manzanas con sus correspondientes intervalos de fuerzas de impacto (N) para cada grupo y la fuerza de impacto media (N) aplicada a las frutas de cada grupo.

GRUPOS DE MANZANAS	INTERVALO DE FUERZA DE IMPACTO (N)	FUERZA DE IMPACTO MEDIA (N)
A	<0,241	0,000 ± 0,000
B	0,241-0,295	0,241 ± 0,005
C	0,295-0,348	0,305 ± 0,002
D	0,348-0,401	0,360 ± 0,004
E	0,401-0,454	0,420 ± 0,015
F	0,454-0,507	0,472 ± 0,015
G	0,507-0,561	0,530 ± 0,020

En la Fig. VI.3.2., se establece la relación entre la fuerza del impacto y la altura desde la cual, una manzana de las características de la manzana impactada debería caer para recibir un impacto de fuerza semejante a la del impacto recibido mediante el péndulo. Las alturas de impacto corresponden a las alturas de caída libre más comunes de las frutas durante la postrecolección, tal como han señalado diversos autores (Chen y Ruiz-Altisent, 1993; Bajema y Hide, 1998; Bajema *et al.*, 2000; Ortiz-Cañavate, *et al.*, 2001).

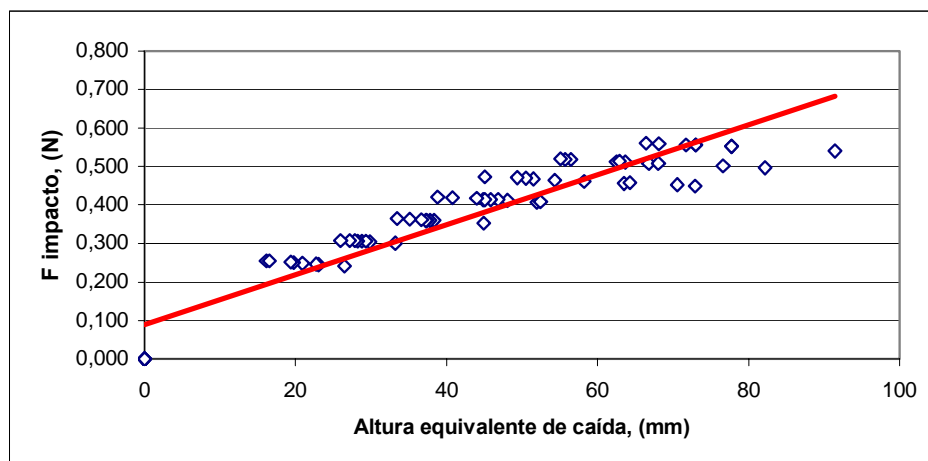


Fig. VI.3.2. Relación entre fuerzas de impacto (N) y alturas equivalentes de caída (mm).

Los valores de altura equivalente de caída libre sobre una superficie rígida representados en la Fig. VI.3.2. se obtuvieron considerando que la energía de impacto (E_i) es toda de tipo potencial (Ec. VI.3.9.), es decir de tipo caída libre (Hyde, 1997):

$$E_i = m_1 \cdot h_1 \cdot g = m_2 \cdot h \cdot g \quad (\text{VI.3.9.})$$

siendo:

m_1 : masa del péndulo (kg)

h_1 : altura del péndulo, función del ángulo (m)

g : aceleración de la gravedad (m s^{-1})

m_2 : masa de la fruta (kg)

h : altura equivalente de caída (m).

Y por tanto (Ec. VI.3.10.):

$$h = \frac{m_1 \cdot h_1}{m_2} \quad (\text{VI.3.10.})$$

Realmente, las alturas de caída calculadas están supervaloradas, puesto que en una línea real de manipulación de la fruta tendría que considerarse también la propia energía cinética con la que llega la fruta al punto de caída.

VI.3.2. EVALUACIÓN DE LA TASA RESPIRATORIA

A partir de los correspondientes cromatogramas obtenidos en cada uno de los análisis efectuados a cada fruta de acuerdo a la metodología detallada en el Apto. V.3., se calculó la evolución de la tasa respiratoria, definida a partir de la producción de CO_2 (TR_{CO_2}), consecuencia de la actividad metabólica del fruto, aplicando el modelo matemático expuesto en el Apto. V.3.

En la Fig. VI.3.3. se muestra un ejemplo del proceso de cálculo a partir de la evolución en el espacio de cabeza de la fracción molar de CO_2 durante el tiempo de ensayo realizado a una de las manzanas analizadas (100 minutos con toma de muestra cada 20 minutos). En este ejemplo se trata de una fruta perteneciente al grupo D, golpeada con una fuerza de impacto de 0,362N, y analizada a 21°C, el 7º día de almacenamiento tras haber sido aplicado el impacto mecánico.

Con la pendiente de la curva obtenida y demás variables utilizadas: presión, volumen de aire libre en la cámara respiratoria, constante de los gases ideales, temperatura y masa de la fruta, se calculó la tasa respiratoria con la Ecuación V.3.16.

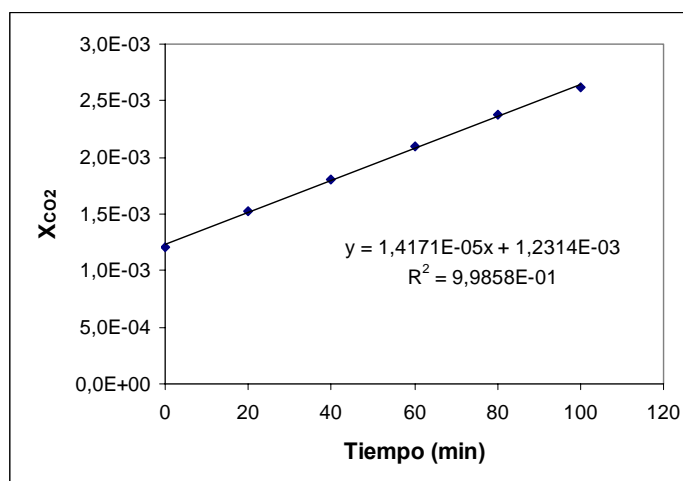


Fig. VI.3.3. Evolución de la fracción molar del anhídrido carbónico (x_{CO_2}) de una manzana con el tiempo del ensayo (minutos).

Teniendo en cuenta el agrupamiento de las manzanas de acuerdo a la fuerza de impacto de Timoshenko recibida (N), se determinó la evolución de las tasas respiratorias con el tiempo de almacenamiento (Fig. VI.3.4.).

Los valores de las tasas respiratorias de las manzanas control -sin golpear (Grupo A) se encuentran en el orden de los valores encontrados en bibliografía para tasas respiratorias en manzanas sanas a la temperatura del ensayo (21°C) (Primo Yúfera, 1997, Mitcham *et al.*, 2004).

Como puede observarse en la Fig. VI.3.4., la elevada dispersión de los resultados obtenidos no permite la diferenciación entre el efecto de las distintas variables analizadas.

Un análisis de la varianza (ANOVA) multifactor para observar el efecto de la intensidad de la fuerza de impacto y tiempo de almacenamiento sobre la evolución de la tasa respiratoria en manzanas no permitió observar efectos significativos de las variables. La elevada dispersión de los resultados podría explicarse en base a la variabilidad propia de la materia prima. Según Ceballos *et al.* (1992), los niveles de daño dependen mucho de la variedad y, sobre todo,

del estado de madurez del fruto, de forma que un mismo impacto no causa los mismos daños sobre todos los frutos.

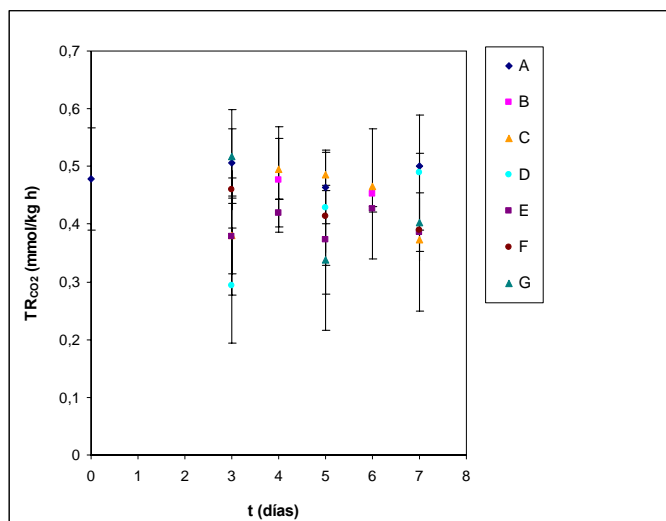


Fig. VI.3.4. Variación de la tasa respiratoria TR_{CO_2} ($mmolCO_2/kg h$) con la intensidad del impacto mecánico y el tiempo de almacenamiento.

Si bien no se detectaron diferencias significativas en las tasas respiratorias entre los grupos de fuerza aplicados, parecen advertirse algunas tendencias. Así, parecen observarse ligeros descensos en la actividad metabólica en los primeros días evaluados como consecuencia del estrés aplicado, con tendencia a recuperar los valores normales.

En un estudio realizado por Del Río *et al.* (2000) sobre impactos que reciben los cítricos en las distintas líneas de confección de un almacén, las tasas respiratorias registradas entre la salida de confección y la permanencia durante 10 días a 20°C aumentaron levemente, situándose sus valores finales en el rango de los valores normales.

Estas tendencias observadas podrían explicarse por el mecanismo general de estrés/respuesta que se manifiesta en las plantas (Tadeo, 2000), que consta básicamente de 4 fases:

a) Fase de alarma: el golpe recibido introduce al fruto en lo que se denomina la fase de alarma que es concomitante con la activación de los mecanismos de que dispone para hacer frente al estrés. En condiciones medioambientales normales, las plantas presentan un estado fisiológico característico y óptimo, y cuando se presenta un factor de estrés (golpe en este caso), reaccionan ralentizando o deteniendo sus funciones fisiológicas básicas y reduciendo su vigor.

b) Fase de resistencia: las plantas que no poseen mecanismos adecuados de defensa o de respuesta frente al estrés experimentan daños irreversibles y mueren. El desenlace es el mismo cuando la situación de estrés es muy intensa y supera la capacidad de respuesta de la planta. La activación de los mecanismos defensivos o de respuesta conduce a la acomodación del metabolismo celular a las nuevas condiciones, a la activación de los procesos de reparación de la maquinaria celular dañada y a la expresión de las adaptaciones morfológicas adecuadas. En esta fase de resistencia, los cambios que se producen permiten a la planta alcanzar un nuevo estado fisiológico óptimo para las actuales condiciones, estado que se corresponde con el grado máximo de resistencia que puede alcanzar.

c) Fase de agotamiento: si la situación de estrés se mantiene durante un tiempo excesivo, se agota la capacidad de resistencia y la planta ralentiza o detiene nuevamente sus funciones. Esta fase de agotamiento de la resistencia culmina con la muerte de la planta si la situación de estrés no desaparece a tiempo.

d) Fase de regeneración: cuando el estrés desaparece, las funciones fisiológicas de la planta pueden regenerarse y alcanzarse un nuevo estado fisiológico óptimo para las condiciones presentes.

Los ligeros descensos de las TR_{CO_2} podrían estar determinados por la fase de alarma frente al estrés y los posteriores aumentos detectados por la fase de regeneración de las frutas, en que se pudiera producir una activación del

metabolismo del fruto para proveer de la energía necesaria para la reparación de las zonas dañadas mecánicamente.

Por otra parte, también podrían explicarse los aumentos de la tasa respiratoria a partir de un determinado momento, si el daño es suficientemente intenso como para facilitar la difusión de gases, observándose un incremento transitorio de la intensidad respiratoria por el escape de gas acumulado en los espacios intercelulares (Kays, 1991). Realmente, este aumento detectado supondría un falso incremento en la actividad metabólica, por lo que llegado un momento determinado, deja de producirse la salida de gas y probablemente, si el tiempo de análisis fuera mayor, podrían observarse nuevos cambios en la concentración de gases analizada.

En resumen, el nivel de fuerza de impacto de Timoshenko aplicada no es suficiente para detectar variaciones en la tasa de respiración de los frutos en el tiempo de almacenamiento analizado. Según (Hyde, 1997), los impactos mecánicos entre una esfera elástica (manzanas; naranjas) y una masa rígida (péndulo; superficies rígidas en las líneas de confección) deben de sobrepasar un determinado valor umbral, en el que influirán la masa de la fruta, la aceleración del impacto, la velocidad de impacto, radio de curvatura de la fruta, módulo de elasticidad, relación de Poisson, temperatura y nivel de hidratación de la fruta, como para causar un daño que produzca aumentos marcados en las tasas respiratorias de las frutas impactadas.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue aportar algunos puntos que permitieran avanzar en la modelización de la respuesta respiratoria de manzanas impactadas mecánicamente. En este sentido, deberían continuarse los estudios definiendo nuevos niveles de impacto que permitan detectar la respuesta fisiológica frente al factor estrés y, fundamentalmente, ampliar el rango de tiempo analizado para dilucidar la causa de los cambios detectados. Además, la distinta respuesta de la fruta en función de su variedad y fundamentalmente de su estado de madurez resultarán de gran interés para definir las condiciones de manipulación, conservación y comercialización de productos frescos.

VI.3.3. PROPIEDADES ÓPTICAS

Las propiedades ópticas indican la respuesta de un producto a las ondas de luz visible (longitudes de onda: 400 – 700 nm), constituyendo la apariencia un aspecto importante en la evaluación de la calidad de frutas y verduras. La luz reflejada por el producto lleva información utilizada por inspectores y consumidores para juzgar varios aspectos de su calidad (Abbot, 1999).

Dichas propiedades se basan en la reflectancia, la transmitancia, absorbancia o dispersión de la luz por el producto. Cuando una fruta o vegetal es expuesto a la luz, cerca de un 4% de la luz incidente es reflejada por la superficie externa, causando reflectancia especular o brillo y el 96% restante de la energía incidente es transmitida a través de la superficie hacia la estructura celular del producto donde es dispersada por las pequeñas interfaces dentro del tejido o es absorbida diferencialmente por los distintos constituyentes celulares (Birth, 1976). Muchas veces, la compleja estructura física de los tejidos vegetales crea un producto denso desde el punto de vista óptico que es difícil de ser atravesado por la luz y que a su vez altera la trayectoria del haz luminoso incidente, de manera que la cantidad de tejido involucrado no es conocido con certeza. La mayoría de la energía luminosa penetra sólo a una distancia muy corta y el color vendrá dado por la cantidad de luz emitida por el cuerpo (Abbot, 1999).

En el presente trabajo se analizaron los cambios en los distintos parámetros de color con el tiempo de almacenamiento con el fin de identificar el efecto de los daños mecánicos aplicados. Dichos cambios se expresan como magnitudes reducidas para eliminar la posible variabilidad de las muestras analizadas. Se analizaron las siguientes magnitudes psicofísicas: tono (h^*); croma (c^*); cambios de color (ΔE); luminosidad (L^*); componente rojo o verde (a^*); componente amarillo o azul (b^*), frecuentemente utilizados en materiales vegetales (Hutchings, 1999).

Tono (h^*)

En la Fig. VI.3.5. se muestra la evolución de la magnitud psicofísica tono reducida (h^*/h_0^*) en función del tiempo de almacenamiento y la magnitud del golpe aplicado.

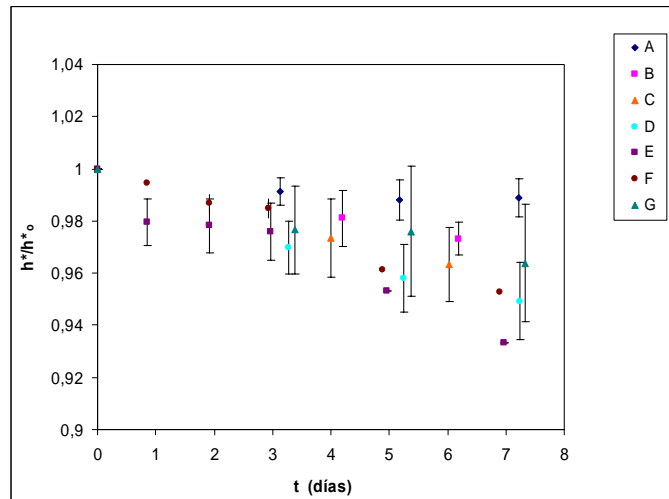


Fig. VI.3.5. Evolución del tono (h^*/h_0^*) en la zona afectada respecto del tiempo de almacenamiento (días).

Con el fin de analizar el efecto de las variables tiempo y fuerza aplicada se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactor utilizando el método de comparación múltiple, LSD (mínima diferencia significativa) para observar diferencias entre medias.

Como puede observarse, el tono de las muestras varía significativamente ($\alpha < 0,001$) con el tiempo de almacenamiento. Mientras que en las manzanas sanas (grupo A) no parece existir una variación del parámetro analizado con el tiempo, cuando la fruta ha sufrido un impacto mecánico, el valor del tono en la zona golpeada parece disminuir con el tiempo de almacenamiento, llegando este descenso, en algunas muestras y en el período estudiado, hasta un 6% con respecto al valor inicial.

Aunque existen diferencias significativas ($\alpha < 0,001$) por efecto de la intensidad del golpe, estas diferencias se aprecian entre las manzanas no golpeadas y las golpeadas. En estas últimas (grupos B al G) no se observan diferencias en la variable estudiada frente a la variable respuesta. Probablemente, las diferencias en la intensidad del golpe entre ellas no sean suficientes para detectar cambios importantes en la magnitud analizada. Además, la respuesta de una esfera elástica (manzana en este caso) a la fuerza de impacto de una superficie rígida está condicionada por las distintas características de la fruta (Chen y Ruiz-Altisent, 1993). Tal vez la variabilidad de la fruta, aunque se haya procurado trabajar con lotes lo más homogéneos posibles, pudiera haber influido en este aspecto, dada la gran dispersión de los resultados obtenidos.

El cambio de tono se origina por los cambios en las estructuras celulares causados por los impactos en las frutas que hacen que la luz incidente se refleje de manera diferente a las zonas sin impactar (Abbot, 1999).

Los impactos físicos que una fruta experimenta tienen consecuencias primarias en las membranas de las células individuales, como son los plasmalemas y tonoplastos. Si estas membranas se dañan, por magulladuras o golpes, ya no son capaces de mantener los sistemas separados y los diferentes contenidos celulares, mezclándose enzimas que estaban en el citoplasma con los sustratos ubicados en las vacuolas (compuestos fenólicos por ejemplo), resultando una reacción química que da un color marrón (pardeamiento enzimático) a la zona dañada (Labavitch *et al.*, 1998).

Las pequeñas disminuciones del tono observadas (hacia tonos más rojizos) podrían deberse al hecho de que los golpes fueron realizados con las manzanas enteras cuya piel normalmente es bastante consistente. Esta característica estructural probablemente haya protegido a las frutas de una abundante liberación de enzimas como las poli-fenoloxidasas, de ahí que el pardeamiento enzimático haya sido leve y por ende la disminución del tono haya sido muy suave.

Disminuciones de tono también fueron constatadas en manzanas sometidas a la acción estresante del pelado y cortado y almacenamiento en oscuridad a 4°C, a los 3 días de almacenamiento respecto al valor de la variable en el día cero (Rocha y Morais, 2003).

Croma (c^*)

El croma es el parámetro cromático que indica la intensidad o saturación del color cuantificando la proporción de los valores de a^* y b^* que existe en el color medido.

En la Fig. VI.3.6. se representa la evolución del valor del croma (referido al valor inicial) analizado en todas las muestras. Se puede observar que existe una ligera variación (ligero aumento) del croma en las manzanas que no han sido dañadas (Grupo A), probablemente por efecto del avance de la maduración y las condiciones de almacenamiento, tendiendo con el tiempo a recuperar el valor inicial. Resultados similares han obtenido Sapers y Douglas (1987) en manzanas var. "Red Delicious", almacenadas a 4°C, de aumento del croma en los primeros 3 días de almacenamiento.

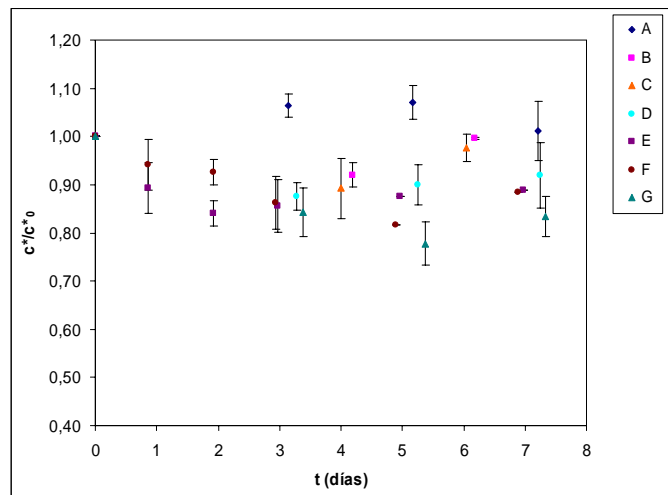


Fig. VI.3.6. Evolución del croma (c^*/c^*_0) en la zona impactada en función del tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.

Por efecto de los golpes, la zona dañada disminuye su croma, tendiendo, con el tiempo, de forma similar a las no golpeadas, a recuperar su valor inicial.

Este hecho podría estar relacionado con las distintas fases del mecanismo estrés/respuesta comentado con anterioridad, reflejando una primera fase de adaptación de la fruta frente a la situación de estrés originada, manifestándose, en las zonas dañadas, por una deshidratación o un pardeamiento enzimático por la liberación de enzimas que pudiera causar la disminución en la intensidad o pureza del color verde inicial por el consecuente aumento del color rojo. Con el tiempo, comenzaría a producirse una fase de regeneración celular.

Se realizó un análisis de la varianza multifactor con el fin de observar el efecto de los factores fuerza de impacto de Timoshenko y tiempo sobre la evolución de la variable respuesta croma. En el mismo se detectaron diferencias significativas en el 99% de los casos para ambos factores.

Analizando la influencia del nivel de impacto sobre la variación del factor analizado, pueden observarse dos grupos homogéneos de muestras, uno correspondiente a las manzanas no golpeadas (grupo A) y otro en el que no existen diferencias entre sí, correspondiente a todas las manzanas golpeadas. Por tanto, y como se ha comentado anteriormente, dentro de las manzanas golpeadas, si bien se advierte una cierta tendencia a la disminución del croma conforme aumenta la fuerza de impacto, la diferencia entre la intensidad aplicada no es suficiente para detectar diferencias en el tiempo de almacenamiento analizado.

Cambios de Color (ΔE^*)

Los cambios de color (Fig. VI.3.7.) respecto del valor inicial de color previo al golpe sí marcan un cambio y en ellos se ve una clara diferencia entre impactos. Los mayores cambios se dan en las manzanas que recibieron un mayor impacto (Grupo G), notándose ya el cambio de color en la medida inmediatamente posterior al golpe en todos los casos, siendo muy notorios también en los grupos E y F.

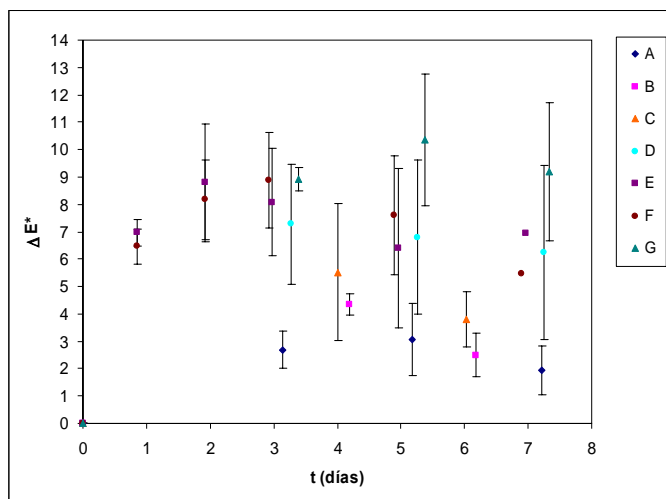


Fig. VI.3.7. Evolución de los cambios de color (ΔE^*) con el tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.

Para ver el efecto de los factores fuerza de impacto y tiempo de almacenamiento sobre la variable respuesta cambios de color, se realizó un análisis de la varianza multifactor, en el cual se pudo observar que ambos factores influyen significativamente sobre la variable respuesta ($\alpha < 0,001$).

Tal se aprecia en la Fig. VI.3.7. y se ha reflejado en el análisis estadístico, existen diferencias significativas entre las manzanas no golpeadas y las manzanas golpeadas.

Dentro de las golpeadas se puede advertir cierta tendencia al aumento de los cambios de color a medida que aumenta la fuerza de impacto, si bien no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Por tanto, la fuerza de impacto no es suficiente para detectar diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento analizado.

Respecto al tiempo de almacenamiento, se observan diferencias significativas entre las manzanas golpeadas y las no golpeadas. Dentro de las manzanas golpeadas, si bien no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, sí parece advertirse una cierta tendencia a aumentar en los

primeros días de almacenamiento para luego estabilizarse al final del período de tiempo estudiado.

El aumento en los cambios de color tal vez se deba a que los golpes alterarían las estructuras de las células superficiales causando una reflexión diferente de la luz incidente, originando cambios en el color reflejado y por lo tanto, aumentos en los cambios de color respecto al tiempo de almacenamiento.

Luminosidad (L^*)

El parámetro cromático luminosidad (L^*) es un atributo según el cual una superficie parece emitir más o menos luz.

El valor de la Luminosidad (L^*) es un indicador muy útil en el oscurecimiento durante el almacenamiento, ya sea que se produzca por reacciones de pardeamiento enzimático o por aumento de la concentración de pigmentos vegetales (Goupy *et al.*, 1995). Normalmente una disminución de L^* y un aumento de a^* son indicativos de un pardeamiento (Mastrocola y Lerici, 1991; Monsalve-González *et al.*, 1993).

En la Fig. VI.3.8. se representa la variación de la tasa Luminosidad/Luminosidad previa al golpe (L^*/L^*_0).

En términos generales se puede observar una tendencia decreciente de la Luminosidad pero también una gran dispersión en los valores cuando aumenta la fuerza de impacto.

Esto se podría deber a que en la zona afectada por los impactos, hubiera pequeñas zonas alteradas en la estructura celular de la superficie de la manzana, haciendo que los rayos que inciden en la zona dañada sean reflejados de manera diferente (que hubiera mucha dispersión y absorción de parte de los mismos) a las zonas sanas y que ello explicara dicha variabilidad. En las manzanas sanas no se observaron prácticamente cambios en la luminosidad con el tiempo de almacenamiento.

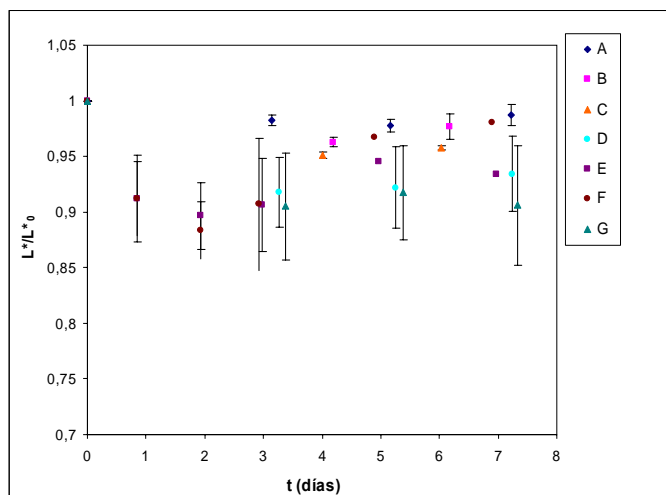


Fig. VI.3.8. Evolución de la Luminosidad (L^*/L^*_0) con el tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.

Para observar el efecto de los factores fuerza de impacto y tiempo de almacenamiento sobre la evolución del parámetro Luminosidad, se realizó un análisis de la varianza multifactor, observándose diferencias significativas ($\alpha < 0,001$) por efecto de ambas variables. Como se aprecia en la Fig. VI.3.8. y se reflejó en el análisis estadístico, existen diferencias significativas entre las manzanas no golpeadas y las golpeadas.

Dentro de las manzanas golpeadas, no se observan diferencias significativas entre los grupos de fuerza de impacto. Por lo tanto, la fuerza de impacto aplicada no es suficiente para detectar diferencias significativas en el tiempo analizado.

Respecto al factor tiempo, se han detectado diferencias significativas entre las manzanas no golpeadas y las golpeadas. Dentro de las manzanas golpeadas, si bien no se detectaron diferencias significativas entre los grupos parece advertirse cierta tendencia al descenso de la luminosidad con el tiempo de almacenamiento.

La tendencia obtenida en las manzanas impactadas en este trabajo de la disminución de su Luminosidad (L^*) con el tiempo de almacenamiento fue

similar a la tendencia obtenida por Rocha y Morais (2003), en que también la L^* disminuyó en manzanas (var. Jonagored) mínimamente procesadas. Dichos autores asumieron que se debió al pardeamiento enzimático causado por el daño tisular con el consecuente contacto de enzimas con sustratos. Este proceso también pudo haber ocurrido en las manzanas impactadas.

Parámetro a^*

El parámetro cromático a^* indica la proporción de componente rojo (valores positivos)-verde (valores negativos) en el color medido.

Si se analiza la evolución del cociente de la variable (a^*/a^*_0) (Fig. VI.3.9.), se observa que disminuye a lo largo del tiempo de almacenamiento, lo que indicaría que hay una tendencia del parámetro a^* hacia el color rojo.

Es posible apreciar que en los grupos B al G (manzanas golpeadas) el valor de a^* disminuye a partir del valor control, lo que desde el punto de vista óptico indica que su componente verde disminuye y por lo tanto ganarán tonos más rojizos.

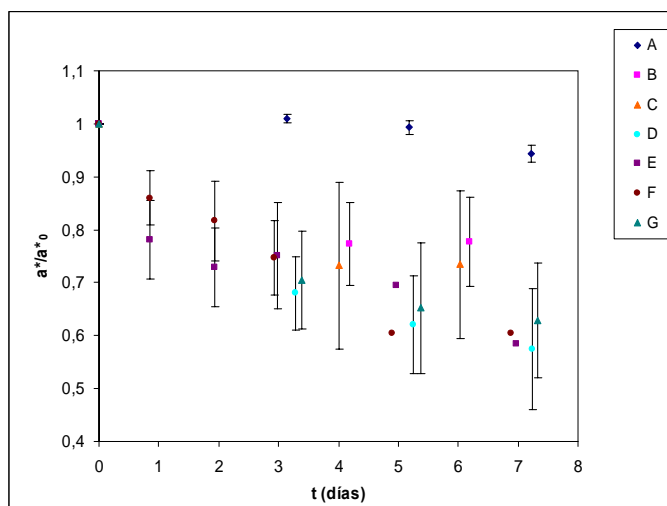


Fig. VI.3.9. Evolución de a^*/a^*_0 con el tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.

Se ha realizado un análisis de la varianza multifactor para ver el efecto de los factores fuerza de impacto de Timoshenko y el tiempo de almacenamiento sobre la evolución del parámetro de color a^* . En el mismo se pudieron apreciar para ambos factores diferencias significativas en el 99% de los casos.

Como se aprecia en la Fig. VI.3.9. y queda reflejado en el análisis estadístico, existen diferencias significativas entre las manzanas no golpeadas y las manzanas golpeadas. Sin embargo respecto a la intensidad del impacto, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras golpeadas. Por tanto la fuerza de impacto aplicada no es suficiente para detectar diferencias en el tiempo de almacenamiento analizado.

Respecto al tiempo, se observan diferencias significativas entre las manzanas no golpeadas y las manzanas golpeadas. Mientras en las frutas control (grupo A) no se aprecian cambios importantes del parámetro por efecto del tiempo de almacenamiento, un impacto en la fruta se manifiesta en un descenso paulatino del valor de a^* .

Parámetro b^*

El parámetro cromático b^* indica la proporción de componente amarillo (valores positivos) – azul (valores negativos) en el color medido.

En la Fig. VI.3.10. se aprecia la evolución del cociente b^*/b_0^* con el tiempo de almacenamiento para los distintos grupos de manzanas analizados.

Con el objetivo de analizar el efecto de los factores fuerza de impacto de Timoshenko y tiempo de almacenamiento, se llevó a cabo un estudio estadístico de los datos aplicando un análisis de la varianza multifactor, en el cual se pudo ver que existe un efecto significativo ($\alpha < 0,001$) de ambos factores.

Salvo en el grupo control (A) y los grupos B y C, en el resto de los grupos (D al G), la tendencia es decreciente respecto del valor previo al impacto.

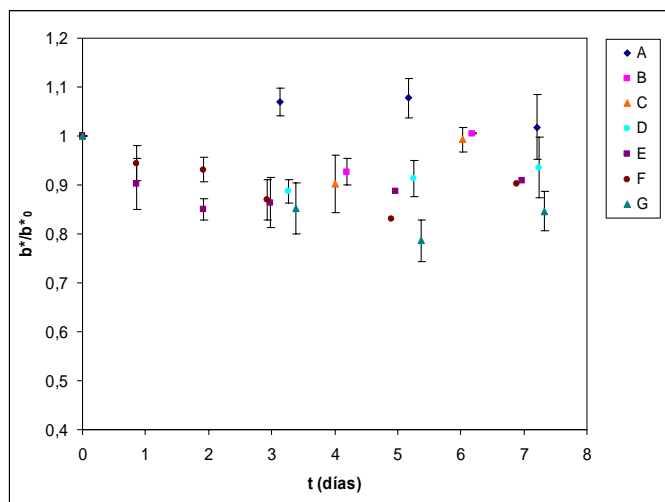


Fig. VI.3.10. Evolución de b^*/b^*_0 con el tiempo de almacenamiento y la fuerza media de impacto aplicada.

A mayores fuerzas de impacto se observa una disminución del cociente, lo que pondría de manifiesto, junto a la disminución del parámetro a^* mencionada anteriormente, una necrosis del tejido (Kays, 1991) tanto más intensa cuanto mayor es el impacto recibido.

Una tendencia similar, es decir, una disminución en el valor del parámetro de color b^* fue encontrada en manzanas de la variedad Oregon Spur respecto al tiempo de almacenamiento (Ribeiro *et al.*, 2004).

Cabe señalar que a partir del cuarto día de almacenamiento, los frutos dañados más levemente parecen tender a recuperar los valores iniciales (similares al grupo A), lo que podría indicar que estos tejidos pudieran estar regenerándose. Esta recuperación del tejido ha sido constatada en frutos cítricos (Eaks, 1961) y en tubérculos (Kahl, 1978).

VI.3.4. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de la fruta y el efecto de los impactos sobre las mismas fueron evaluadas mediante los ensayos de punción tal como se describe en el apartado VI.2.5.1.

Los valores de éstos parámetros mecánicos se muestran en la Tabla VI.3.3. Estos parámetros permiten caracterizar la diferente respuesta a la deformación de las muestras después de los impactos.

En todos los análisis de la varianza multifactor de los parámetros de textura el tiempo de almacenamiento no resultó significativo, por tanto se muestran los resultados en función de la fuerza de impacto de Timoshenko media aplicada a cada grupo de manzanas.

Las pequeñas desviaciones que se han detectado pueden ser atribuibles a la propia variabilidad de las manzanas. Dentro de esa desviación se incluyen factores como masa de la manzana, grado de madurez, etc., factores intrínsecos al espécimen particular de cada ensayo y factores no controlables en el estudio, ya que cada ensayo se tenía que realizar con una manzana distinta.

En la Tabla VI.3.3. es posible observar que los valores de la fuerza máxima de penetración del punzón va disminuyendo conforme se ha aumentado la fuerza del impacto. Este efecto puede verse más claramente en la Fig. VI.3.11.

Tabla VI.3.3. Valores medios y sus desviaciones estándar de fuerzas de impacto aplicadas (F_{impacto}) y de los parámetros mecánicos obtenidos. F_{max} : fuerza máxima; d_{max} : distancia máxima; punto de ruptura ($F_{\text{max}}/d_{\text{max}}$); E_L (N/mm); Dureza (N/mm).

Grupo	F_{impacto} (N)	F_{max} (N)	d_{max} (mm)	$F_{\text{max}}/d_{\text{max}}$ (N/mm)	E_L (N/mm)	Dureza (N/mm)
A	0 ± 0,0	73 ± 9	2,9 ± 0,3	26 ± 2	0,6 ± 0,2	291 ± 85
B	0,251 ± 0,003	62 ± 12	2,7 ± 0,2	22 ± 3	0,19 ± 0,07	74 ± 25
C	0,305 ± 0,001	60 ± 6	2,6 ± 0,3	23,1 ± 2,7	0,21 ± 0,06	57 ± 9
D	0,362 ± 0,002	59 ± 9	2,8 ± 0,2	20,2 ± 1,9	0,16 ± 0,05	61 ± 2
E	0,414 ± 0,002	55 ± 4	3,1 ± 0,3	17,7 ± 1,5	0,12 ± 0,04	50 ± 10
F	0,467 ± 0,004	55 ± 7	3,3 ± 0,2	17,6 ± 1,6	0,15 ± 0,05	53 ± 11
G	0,536 ± 0,021	52 ± 6	3,5 ± 0,2	15,1 ± 1,9	0,12 ± 0,05	52 ± 10

Fuerza Máxima ($F_{\text{máx}}$):

En la Fig. VI.3.11. se representa gráficamente la fuerza máxima (fuerza necesaria para fracturar a la muestra) de las zonas impactadas en los distintos grupos de manzanas ordenados según la fuerza de impacto de Timoshenko.

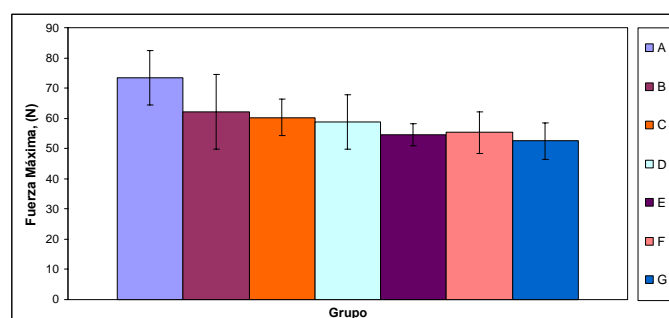


Fig. VI.3.11. Fuerza máxima de penetración según la fuerza media de impacto de Timoshenko recibida.

Un análisis de la varianza para estudiar el efecto de la fuerza de impacto de Timoshenko en la evolución de la variable respuesta fuerza máxima reveló que dicho factor tiene una influencia significativa sobre la fuerza máxima ($\alpha < 0,001$).

Como se ve en la Fig. VI. 3.11. y queda reflejado en el análisis estadístico, el hecho de recibir un impacto mecánico afecta de forma significativa la estructura de la piel, disminuyendo los valores de fuerza máxima de penetración. Esta disminución de la fuerza máxima de penetración podría estar relacionada con la liberación de enzimas a causa del golpe que catalizarían procesos de degradación de la pared celular en la zona dañada.

Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el valor de la variable en función de la intensidad del impacto (grupos B al G) dentro de los rangos y el tiempo analizados.

Distancia máxima (d_{max}):

La distancia máxima de penetración es aquella donde el punzón ejerce la fuerza máxima. Dicho parámetro brinda una idea de la profundidad del daño del impacto.

En la Fig. VI.3.12. se representa los valores de distancia máxima obtenidos en función de la fuerza del impacto.

Se ha realizado un análisis de la varianza para el factor fuerza media de Timoshenko aplicada a las manzanas con el fin de analizar la evolución de la variable respuesta distancia máxima. En el mismo se detectaron diferencias significativas en el 99% de los casos para dicho factor.

Tal como se observa en la gráfica y queda reflejado en el análisis estadístico, únicamente a partir de fuerzas de Timoshenko medias de 0,42N (Grupo E) pueden detectarse un cambio significativo en la profundidad de penetración de la lesión.

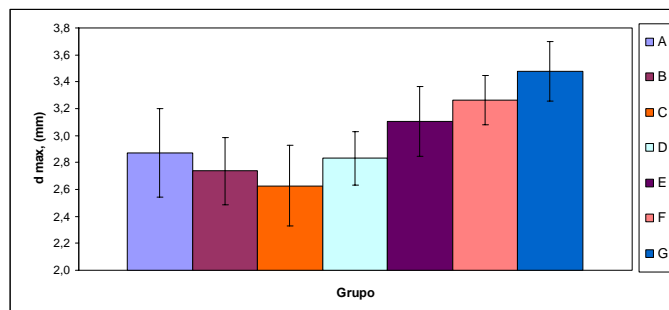


Fig. VI.3.12. Valores medios y sus desviaciones de distancia máxima por grupo de fuerza media de impacto recibida por las manzanas.

Por tanto, parece reflejarse que pequeños impactos producirán una alteración importante a nivel muy superficial, mientras que mayores golpes, si bien la alteración de la superficie será muy similar, el daño alcanza profundidades mayores.

Pendiente en el tramo lineal de la gráfica fuerza/distancia (E_L):

El cociente entre la fuerza inicial de penetración del punzón y la profundidad o distancia inicial, es decir, la pendiente en la zona lineal, dará una idea aproximada de la rigidez de la zona afectada por el golpe.

Se observa (Fig. VI.3.13.) una clara diferencia entre las manzanas sin golpear, muy rígidas, frente a las manzanas golpeadas, que mantienen todas un comportamiento elástico muy similar, lo que implica que la piel de la manzana se hace más elástica con la intensidad del impacto.

Sin embargo, dentro de las muestras golpeadas no se encuentran diferencias significativas respecto a la intensidad de la fuerza de impacto de Timoshenko media aplicada.

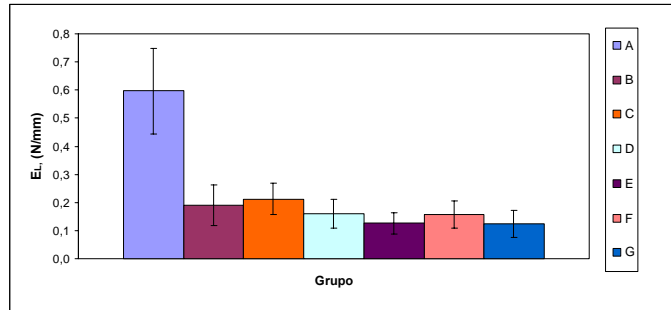


Fig. VI.3.13. Pendiente en el tramo lineal (E_L) (N/mm) en función de los grupos de fuerza media de impacto recibida.

Dureza:

Como se ha definido previamente la dureza se define como la energía requerida para propagar una fractura para un área rota dada, es decir, es la resistencia a la fractura y se determina como el área por debajo de la curva fuerza-distancia. Los valores de este parámetro obtenidos se representan en la Fig. VI.3.14.

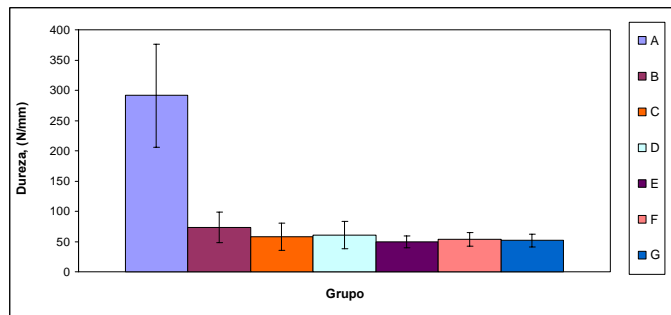


Fig. VI.3.14. Dureza de las muestras en función de la fuerza de impacto aplicada.

Con el fin de estudiar el efecto de la fuerza de impacto de Timoshenko sobre la variable dureza, se realizó un análisis estadístico de la varianza para un solo factor que reflejó diferencias significativas en el 99% de los casos.

Como puede observarse en la Fig. VI.3.14. y queda reflejado en el análisis estadístico, las diferencias observadas son debidas al propio hecho del impacto. Así, las muestras no golpeadas aparecen mucho más duras y significativamente diferentes de las manzanas golpeadas. En estas, no se observan diferencias por los distintos niveles de impacto aplicados.

Este fenómeno está en concordancia con el parámetro E_L (pendiente en el tramo lineal de la gráfica fuerza vs deformación) que también disminuye por efecto de los impactos.

Punto de ruptura/corte (F_{max}/D_{max}):

El cociente entre la fuerza máxima y la deformación máxima denominado como punto de ruptura/corte de la textura, sigue una tendencia similar al cociente entre la fuerza en la zona lineal y la distancia en la zona lineal aunque su evolución decreciente no es tan acusada (Fig. VI.3.15.) ni la diferencia entre manzanas no golpeadas y manzanas con impacto, tan grande.

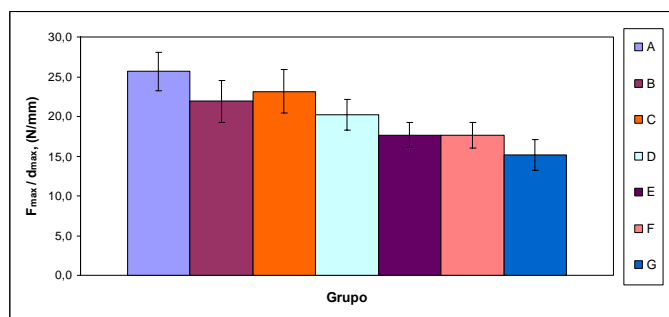


Fig. VI.3.15. Punto de ruptura/corte de la textura en función de los grupos de fuerza de impacto.

Un análisis estadístico de la varianza reflejó un efecto significativo ($\alpha < 0,001$) de la fuerza media de impacto de Timoshenko sobre el parámetro punto de ruptura/corte.

Las manzanas del Grupo A (control) presentan el mayor valor de punto de corte. En manzanas golpeadas dicho valor va decreciendo, tanto más cuanto mayor es la fuerza de impacto. Este hecho está relacionado con el aumento en la distancia de penetración de la lesión por efecto del impacto comentado anteriormente.

VI.3.5. CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES

Es bien sabido que el análisis del contenido en sólidos solubles es un buen parámetro indicativo del grado de maduración de los frutos. En este trabajo se ha analizado la posible variación en el contenido en sólidos solubles de la zona afectada por un impacto mecánico, como un posible factor orientador sobre la calidad del fruto dada su sencillez y rápida aplicación.

Los resultados obtenidos se analizaron de forma relativizada, hallando el cociente de los °Brix de las zonas afectadas por golpe y de las zonas libres de impactos, para cada grupo de fuerza media de impacto de Timoshenko y día de almacenamiento post impacto (Fig. VI.3.16).

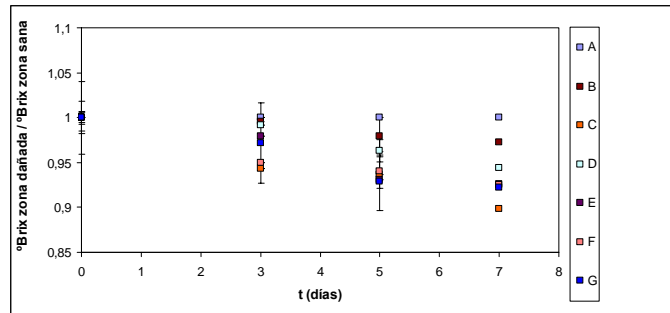


Fig. VI.3.16. Variación en el tiempo (días) del cociente °Brix zona dañada / °Brix zona sana según los grupos de fuerza media de impacto de Timoshenko recibida.

Se aplicó un análisis de la varianza multifactor a los datos obtenidos del cociente de los °Brix zona dañada/°Brix zona sana como variable respuesta frente a la fuerza de impacto media de Timoshenko aplicada según los distintos

grupos de manzanas y al tiempo de almacenamiento (días) como variables explicativas, para analizar si existe un efecto significativo desde el punto de vista estadístico de estos factores sobre dicha respuesta.

En dicho análisis se pudo ver que tanto la fuerza de impacto de Timoshenko como el tiempo de almacenamiento resultaron significativos sobre la variable respuesta en el 99% de los casos.

En la fruta sana no se observan cambios significativos en el contenido en sólidos solubles en el periodo de tiempo analizado.

Sin embargo, cuando la fruta es impactada se detecta una disminución en el tiempo de este parámetro, tanto más intensa cuanto mayor es la fuerza de impacto recibida. Probablemente, esta reducción estaría relacionada con la utilización de los mismos como sustratos respiratorios para proveer de energía necesaria para la reparación del tejido frutal dañado por el impacto (Ackermman *et al.*, 1992).

VI.4. CONCLUSIONES

- Con el sistema empleado para efectuar pequeños impactos mecánicos a la fruta pueden simularse los golpes recibidos por la fruta en las líneas de manipulación. Su intensidad puede cuantificarse, resultando del mismo orden que la observada por diversos autores mediante medidas reales en línea.
- El nivel de fuerza de impacto de Timoshenko aplicada no es suficiente para detectar variaciones en la tasa de respiración de los frutos en el tiempo de almacenamiento analizado con el sistema de análisis utilizado. Deberían continuarse los estudios definiendo nuevos niveles de impacto que permitan detectar la respuesta fisiológica frente al factor estrés y, fundamentalmente, ampliar el rango de tiempo analizado para dilucidar la causa de los cambios detectados.
- De forma general, el estrés provocado en la fruta por un impacto mecánico produce cambios en los parámetros de color analizados, observándose ligeros descensos, fundamentalmente durante los primeros días de almacenamiento, en los valores del croma, tono, luminosidad, así como de los parámetros cromáticos a^* y b^* . Esta variación estaría reflejando el comienzo de reacciones de pardeamiento enzimático como consecuencia directa del golpe.
- En algún caso puede observarse, a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, una tendencia a la recuperación de los valores iniciales, tal vez relacionado con la fase de regeneración celular de tejidos. Probablemente, los niveles de impacto aplicados no sean suficientes para producir daños irreversibles en la fruta.
- En ninguno de los parámetros de color analizados ha sido posible diferenciar cambios en los parámetros por efecto del distinto nivel de impacto aplicado. Sería conveniente continuar los estudios ampliando el

tiempo de análisis con el fin de detectar posibles cambios en la respuesta de la fruta, así como ampliar el rango de fuerzas de impacto.

- Los ensayos de carácter destructivo, como la medida de las propiedades mecánicas, parecen reflejar con más intensidad los efectos inmediatos de un impacto mecánico. Así, las zonas afectadas por un golpe se muestran más frágiles, probablemente por la liberación de enzimas que catalizarían procesos de degradación de la pared celular en la zona dañada y la piel de la manzana se hace más elástica con la intensidad del impacto.
- En general, no pudieron detectarse diferencias en los parámetros mecánicos por efecto de la distinta intensidad del impacto aplicado. Sólo a través de la medida de la distancia máxima de penetración pueden detectarse diferencias. Así, pequeños impactos parecen producir una alteración importante a nivel muy superficial, mientras que mayores golpes, si bien la alteración de la superficie es muy similar, el daño alcanza profundidades mayores.
- Durante el período analizado, no se observaron cambios significativos de los parámetros mecánicos por efecto del tiempo de almacenamiento.
- Por efecto del impacto se observa una disminución en el contenido en sólidos solubles en la zona afectada por el golpe, tanto más intensa cuanto mayor es la fuerza de impacto recibida. Esta reducción estaría relacionada con la utilización de azúcares como sustratos respiratorios para proveer de la energía necesaria para la reparación del tejido frutal dañado por el impacto. Este aumento en la actividad respiratoria, sin embargo, no es suficiente para su detección por el sistema de análisis empleado en el estudio.

CAPÍTULO VII
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

FINALES

Los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral permiten abrir un camino hacia el estudio de las respuestas metabólicas de frutas frescas bajo condiciones de estrés.

La detección rápida, a través de análisis de espacio de cabeza, de situaciones de estrés, antes de que aparezcan síntomas visibles de daño, puede resultar de máximo interés para el sector de manipulación, conservación y distribución de productos hortofrutícolas frescos.

Si mediante análisis rápidos de espacios de cabeza puede detectarse un proceso de estrés, se dispondría de una información doblemente útil:

1. Por una parte, podría ser utilizada para la detección de puntos críticos a lo largo de toda la cadena productiva (desde la recolección hasta el punto de venta), y por tanto, contribuir a la mejora de éstos. Con ello se evitarían pérdidas innecesarias de producto y una mejora considerable de su calidad y vida útil.
2. Por otra, podría aportar elementos de control que pudieran ser utilizados en la mejora del diseño de sensores a implantar fundamentalmente en cámaras de conservación y/o transporte. Un detector integral de anhídrido carbónico (CO₂) y volátiles indeseables simultáneamente, permitiría la detección de infecciones fúngicas o lesiones mecánicas con anterioridad a la detección de daños visibles, lo que permitiría la rápida retirada de producto (evitando así la contaminación de otras partidas) y la puesta en marcha de los mecanismos necesarios para su posible recuperación o puesta inmediata en el mercado.

En base a lo expuesto anteriormente, se recomendaría continuar los estudios en la línea planteada en esta Tesis Doctoral. Con la metodología de

VII. – Conclusiones y recomendaciones finales

análisis propuesta, sería conveniente ampliar el rango de condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa), géneros de microorganismos característicos y ampliar el espectro de variedades de cítricos analizadas e incluso abrir el campo a otras frutas, con lo que se dispondría de un amplio conocimiento de las respuestas fisiológicas en frutas frescas frente a cualquier tipo de estrés fúngico. En la misma línea, deberían ampliarse los estudios sobre el efecto de posibles estrés mecánicos en frutas.

CAPÍTULO VIII
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

VIII. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Abad, I.** (2003). "Adecuación a técnicas de frigoconservación de nuevas variedades de cítricos". Tesis Doctoral. Departamento de Postcosecha. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).
- Abeles, F.; Morgan, P.; Saltveit, M.** (1992). "Ethylene in Plant Biology". Second Edition. Academic Press, San Diego, CA, USA, Pp.: 414
- Abbot, J.** (1999). "Quality measurement of fruits and vegetables"- Postharvest Biology and Technology, 15: 207 - 225
- Abouzed, M.; Reddy, C.** (1986). "Direct fermentation of potato starch to ethanol by co cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*". Appl. Envir. Microbiol. 52: 1055 – 1059
- Agustí, M.** (2000). "Citricultura". Ed. Mundi-Prensa, Pp.: 21
- Agustí, M.** (2004). "Fruticultura". Ed. Mundi-Prensa, Pp.: 150
- Agustí, M.** (2000). "Crecimiento y Maduración del fruto" en "Fundamentos de Fisiología Vegetal", McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. y Edicions Universitat de Barcelona Pp.:430 – 433
- Acerenza, L.** (2004). "Modelos teóricos de sistemas biológicos". http://www.anep.edu.uy/derivada/pdf/sist_biologicos.pdf. Fecha de Consulta: 16 de noviembre del 2004.
- Ackermman, J.; Fisher, M.; Amado, R.** (1992). "Changes in sugars and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glokenapfel)". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 1131 - 1134
- Álvarez Requejo, S.** (1998). "El manzano". MAPA. Ed. Aedos. Barcelona.
- Amiot, M.; Tacchini, M.; Aubert, S.; Nicolás, J.** (1992). "Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity". Journal of Food Science, 57 (4): 958 - 962
- Amorós, M.** (1989). "Agrios". Ed. Dilagro, S.A., Pp.: 27
- Amorós, M.** (1999). Producción de Agrios. Ediciones Mundi-Prensa, 17-19; 34

- Andrich, G.; Fiorentini, R.; Tuci, A.; Zinnai, A.; Sommovigo, G.** (1991). "A tentative model to describe respiration of stored apples". Journal of the American Society for Horticultural Science, 116: 478 - 481
- Anónimo,** (2004). "Exportadas 656.178 toneladas de cítricos a países terceros". Valencia Fruits. Edita Sucro SL. Hernán Cortés 5. 46004 Valencia. www.valenciafruits.com, Año XLII, Número 2.161, 11 de mayo del 2004
- Anónimo,** (2003). "Previsión de la producción de cítricos de la comunidad valenciana para la campaña 2003 / 2004". Agrícola Vergel, Pp.: 423 – 424
- Anónimo** (2002) **Técnicas Analíticas de Separación.** .
http://www.prof.uniandes.edu.co/~infquimi/ANALISIS/técnicas_separación/t_separación.htm Fecha de consulta: 29 de junio del 2002
- Anónimo** (2002) **Métodos de Separación.**
<http://www.ur.mx/cursos/diya/química/jescobed/separa.htm>, Fecha de consulta: 29 de marzo del 2002
- Arpaia M.; Kader, A.** (2000). "Recomendaciones para preservar la calidad postcosecha de los cítricos". Levante Agrícola. Especial Postcosecha, 239 – 243
- Artés, F.** (2000). "Tratamientos alternativos para preservar mejor la calidad de los cítricos refrigerados". Levante Agrícola. Especial Postcosecha. Pp.: 229 - 238
- Attaway, J.; Oberbacher, M.** (1968). "Studies on the aroma of intact Hamlin oranges". J. Food Sci. 33: 287 – 289
- Aunión, F.** (2002). "Influencia de los Impactos Mecánicos en Manzanas (Granny Smith) sobre la Respiración y Otras Propiedades Físicas". Trabajo Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. España, Valencia, Noviembre, 2002
- Bhaduri, S.; Palumbo, S.; Turner-Jones, C.; Smith, J.; Marmer, B.; Buchanan, R.; Zaika, L.; Williams, A.** (1991). "Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry". Food Microbiol., 8: 75 - 78
- Baedemaker, J.; Wouters, A.** (1987). "Mechanical properties of apples: 2. Dynamic measurement methods and their use in fruit quality evaluation". Physical properties of foods, 2: 403-416

- Bajema, R.; Baritelle, A.; Hyde, G.; Pitts, M.** (2000). "Factors influencing dynamic mechanical properties of Red "Delicious" apple tissue". American Society of Agricultural Engineers, 43 (6): 1725-1731
- Bajema, R.; Hyde, G.** (1998). "Instrumented pendulum for impact characterization of whole fruit and vegetable specimens". Am. Soc. Agric. Eng., 41(5): 1399-1405
- Bajema, R.; Hyde, G.; Peterson, K.** (1998). "Instrumentation design for dynamic axial compression of cylindrical tissue samples". American Society of Agricultural Engineers, 41(3): 747-754
- Baldwin, E.** (1993). "Citrus fruit". En: *Biochemistry of fruit ripening*. Editado por G. B. Seymour, J. E. Taylor and G. A. Tucker. Chapman and Hill, London, (UK), 107 – 149
- Baldwin, E.; Nisperos- Carriedo, M.; Shaw, P.; Burns, J.** (1995). "Effect of Coating and Prolonged Storage Conditions on Fresh Orange Flavour Volatiles, Degrees Brix, and Ascorbic Acid Levels". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 1321 – 1331
- Beaudry, R.; Cameron, A.; Shirazi, A.; Dostal-Lange, D.** (1992). "Modified atmosphere packaging of blueberry fruit: effect of temperature on package O₂ and CO₂". J. Amer. Soc. Hort. Sci., 117: 436-441
- Beaulieu, J.; Peiser, G.; Saltveit, M.** (1997). Plant Physiol. 113: 431
- Berkaloff; Bourguet; Favard; Lacroix** (1986). "Biología y Fisiología Celular". Tomo II. Ed. Omega S. A., 101 – 115
- Berkaloff; Bourguet; Favard; Lacroix** (1986). "Biología y Fisiología Celular". Tomo II. Ed. Omega S.A., 133 – 139
- Bhowmik, S.; Hulbert G.** (1989). "Effect of Individual Shrink-wrapping on Shelf Life, Eating Quality and Respiration Rate of Tomatoes". Lebensm. Wiss. u. – Technol. 22: 119 – 123
- Biale, J.** (1960). "The Postharvest Biochemistry of Tropical and Subtropical Fruits". Adv. Food Res., 10: 293 - 354
- Biale, J.; Shepherd, A.** (1939). "Identification of acetaldehyde among the volatile products of citrus fruit". Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 37: 543-547

- Biale, J.; Young, R.** (1981). "Respiration and ripening in fruits- Retrospect and prospect in "Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables" (J. Friend and M. J. C. Rhodes, eds.), Chapter 1, Pp.: 1 – 39, Academic Press, New York.
- Birth, G.** (1976). "How light interacts with foods". In: Gaffney, J. J. Jr (Ed.), Quality Detection in Foods. American Society for Agricultural Engineering, St. Joseph, MI, Pp.: 6 - 11
- Bode, A.** (1999). "Transporte y Metabolismo de la Vitamina C". En: "*Simposio Naranja y Salud, noviembre 1994*". Eds. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. Consellería de Agricultura Pesca y Alimentación, 95 –103
- Boehm, J.** (1987). "Ueber die respiration der kartoffel. Bot. Ztg., 45: 671 – 675, 680 - 691
- Bollen, A.; Cox, N.; Dela Rue, B.; Painter, D.** (2001). "A descriptor for damage susceptibility of a population of produce". J. Agric. Engineering Res., 78 (4): 391 - 395
- Bosset, J.; Graber, B; Martin, B.; Knecht, P.** (1982). "New Device for Measuring O₂ Consumption: Application to the Determination of Different Oxidations and Respiratory Quotients". Trav. Chim. Aliment. Hyg. 73: 420 – 437
- Bower, J.; Jobling, J.; Patterson, D.; Ryan, D.** (1998). "A Method for Measuring the Respiration Rate and Respiratory Quotient of Detached Plant Tissues". Postharvest Biology and Technology, 13: 263 – 270
- Brown, G.; Davis, C.; Chambers, M.** (2000). "Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury". Postharvest Biology and Technology, 18: 57 – 65
- Bruemmer, J.** (1989). "Terminal oxidase activity during ripening of Hamlin orange". Phytochemistry, 28: 2901 – 2902
- Bruemmer, J.; Roe, B.** (1985). "Pyruvate dehydrogenase activity during ripening of Hamlin oranges". Phytochemistry, 24: 2105 - 2106
- Cameron, A.; Talasila, P.; Joles, D.** (1995). "Predicting Film Permeability Needs for Modified Atmosphere Packaging of Lightly Processed Fruits and Vegetables". HortScience, 30: 25-34

- Camp Valencia**, (2004). "La previsió de producció de cítrics posa de manifest la necessitat d'ordenar la campanya. Aforament Citrícola / Campanya 2004 / 2005". Actualitat. Nota de Redacció. Núm. 121, Octubre 2004, Pp.: 12 - 13
- Carmena Villarta, M.** (1999). "La Naranja Defendida por los Médicos". En: "*Simposio Naranja y Salud, noviembre 1994*". Eds. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. Consellería de Agricultura Pesca y Alimentación, 15 – 16
- Carvalho C.; Stern, D.; Ortolá, M.; Fito Maupoey, P.** (2003). "Diseño y puesta a punto de un sistema de determinación de la tasa respiratoria en frutos frescos". En: *Ingeniería de Alimentos: nuevas fronteras en el siglo XXI*. Eds.: P. Fito, A. Mulet, A. Chiralt y A. Andrés. Servicio de Publicaciones de la UPV, 531 – 536
- Cayré, M.; Vignolo, G.; Garro, O.** (2001). "Validación y comparación de modelos de crecimiento microbiano". <http://www.UNNE.EDU.AR/CYT/2001/8-EXACTAS/E-005.pdf> Consulta realizada el 06/11/2003
- Ceballos, C.; Anderson, G.; Ruiz Altisent, M; Muir, A.** (1992). "Detección de impactos con frutos electrónicos". Hortofruticultura, 7, (8): 59 - 61
- Colección Española de Cultivos Tipo (CETC).** Universidad de Valencia. Edificio de Investigación. Campus de Burjassot. 46100, Burjassot (Valencia). <http://www.uv.es/cetc> . Obtención de los liófilos de *Penicillium* y consultas realizadas en el mes de octubre del 2001.
- Cháfer, M.** (2000). "Deshidratación Osmótica de Corteza de Naranja (Valencia Late) y Mandarina (Satsuma)". Tesis Doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Chapell, T.; Hamann, D.** (1968). "Poisson's ratio and Young's modulus for apple flesh under compressive loading". Transactions of the ASAE, 11: 608-610
- Chalutz et al.** (1981). Proc. Int. Soc. Citriculture, 2: 773 - 774
- Charlot, G.** (1980). "Curso de Química Analítica General. Tomo I. Soluciones Acuosas y No acuosas". Ed. Toray-Masson, S. A., 101-102

- Cheftel, J.; Cheftel, H.** (1976). "Pardeamiento enzimático y tratamientos físicos en: *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos* (1) 309 – 318 (2) 175 – 202. Editorial Acribia, España.
- CHEMFATE** (1994). "Syracuse Research Corporation's Environmental Fate Data Bases". Syracuse Research Corporation, Syracuse, NY.
- Chen, H.; Hoover, D.** (2003). "Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669". *International Journal of Food Microbiology*, 87: 161- 171
- Chen, P.; Ruiz Altisent, M.** (1993). "Effect of impact mass on firmness sensing of fruits". An ASAE meeting presentation. The American Society of Agricultural Engineers.
- Chiralt, A.; Martínez, N.; Camacho, M.; González, C.** (2000). "Propiedades físicas de los alimentos. Aplicaciones en el control de procesos y productos". Apuntes del Master en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Departamento de Tecnología de Alimentos-UPV, Valencia. Pp.: 1 - 30
- Chiralt, A.; Martínez, N.; Camacho, M.; González, C.** (1998). "Estudio del equilibrio vapor – líquido: sistema etanol – agua" en "Experimentos de Físicoquímica de Alimentos". Ed. Servicio de Publicaciones, Universidad Politécnica de Valencia. Pp.: 33 – 43
- Christie, G.; Macdiarmid, J.; Schliephake, K.; Tomkins, R.** (1995). "Determination of Film Requirements and Respiratory Behaviour of Fresh Produce in Modified Atmosphere Packaging". *Postharvest Biology and Technology*, 6 (1/2): 41-54
- Codina, J.** (2002). Producción de Cítricos en el Uruguay. Pasado, presente y futuro. En: "*La Citricultura Mundial: Análisis y Perspectivas*". Eds.: Universidad Internacional Menéndez Pelayo. España. Valencia, 28 – 31 Octubre, 2002. Tomo II: 1 – 26
- Codina, J.; Pastore, A.** (2003). "Incidencia y medidas para combatir las infecciones fúngicas en los cítricos uruguayos exportados por URUD´OR". Comunicación Personal.

- Cohen, E.; Shalom, Y.; Rosenberger, I.** (1990). "Postharvest ethanol buildup and off-flavour in "Murcott" tangerine fruits". *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 115: 775 - 778
- Constante de la Ley de Henry** (1977). *Journal of Chemical and Engineering Data*, 22: 326-329
- Correa, E.; Barreiro, P.; Ruiz-Altisent, M.; López, M^a.; Miró, R.; Graell, J.** (2001). "Use of a qcm electronic nose to evaluate the aromatic quality in pears and apples" en http://www.atb-Postdam.de/SYMPOSIUM2001/content/Abstracts/Pre_Abtstracts.html
- Cossins, E.** (1978). "Ethanol metabolism in plants". In: HOOK, D.D., and R.M.M. CRAWFORD (Eds.), *Plant Life in Anaerobic Environment*, Science Publishers Inc., Ann Arbor, MI, Pp.: 169 - 202
- Couey, H.** (1982). "Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin". *HortScience*, 17: 162 – 165
- Cuquerella et al.** (1981). *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 2: 734 - 737
- Cuquerella Cayuela, J.** (1999). "Estado actual de la postcosecha de cítricos". *Revista Agricultura*, 807: 862 - 866
- Cuquerella, J.** (1990). "Efectos de Distintos Recubrimientos Céreos y Plásticos en la Fisiología Post-Recolección y En La Calidad de Frutos Cítricos". Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Cruickshank, R.; Wade, G.** (1992). "The Activation of Latent Infections of *Monilinia fructicola* on Apricots by Volatiles from the Ripening Fruit". *J. Phytopathol.*, 136: 107 - 112
- Cruz-Córdova, T.; García-Compeán, H.; Chavarría-Hernández, N.; Rodríguez-Vázquez, R.; Tomasini-Campocoso, A.; Esparza-García, F.; Saucedo-Castañeda, G.** (2003). "Desarrollo del Modelo de Gompertz de 4 Parámetros Reparametrizados para su uso en Bioremediación de Suelos". http://www.cinvestav.mx/cinvestambiente/MP_TeresaCruz.pdf Consulta realizada el 06/11/2003
- Davies, F.; Albrigo, L.** (1994). "Citrus. Crop Production Science in Horticulture". Cab. International. University Press Cambridge (UK)

- Davis, P.** (1970). "Relation of ethanol content of citrus fruits to maturity and to storage conditions". *Proceedings Florida State Horticultural Science*, 83: 294 - 298
- Davis, P.** (1971). "Further studies of ethanol and acetaldehyde in juice of citrus fruits during the growing season and during storage". *Florida State Horticultural Society*, 217 – 222
- Davis, P.** (1973). "Biochemical changes in citrus fruits during controlled-atmosphere storage". *Journal of Food Science* (38): 225 - 229
- Davis, P.; Hoffmann, R.** (1973). "Effects of coatings on Weight Loss and Ethanol Buildup in Juice of Oranges". *J. Agr. Food Chem.*, 21 (3): 455 – 457
- Dela Rue, B.** (1996). "A hierarchical modelling procedure to determine factors in apple bruising". *Postharvest 96, Conference Proceedings, Taupo, New Zealand*
- Del Río, M.; Martínez-Jávega, J.** (1997). "Fisiopatías en Post-Recolección de Cítricos". *Phytoma España*, 90: 40 – 44
- Del Río, M., Mazzuz, C., Gómez De Barreda, L.; Company Sendra, G.** (2000). "Evaluación de los impactos y la influencia de la línea de confección sobre la calidad de frutos de naranja Lanelate". *Todo CITRUS*, 11: 5 – 16
- Dilley, D.; Dewey D.** (1969). "Automated System for Determining Respiratory Gas Exchange of Plant Materials". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 94: 138 - 141
- Eaks, I.** (1980). "Effect of Chilling on Respiration and volatiles of California Lemon Fruit". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105 (6): 865 – 869
- Eaks, I.** (1961). "Techniques to evaluate injury to citrus fruit from handling practices". *Proceedings of the American Soc. Horticultural Sciences*, 78: 190-196.
- Eckert, J.; Ratnayake, M.** (1994). "Role of Volatile Compounds from Wounded Oranges in Induction of Germination of *Penicillium digitatum* Conidia". *Postharvest Pathology and Mycotoxins*, 84 (7): 746 – 750
- El-Gaouth, A.; Smilanick, J.; Wilson, C.** (2000 a). "Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit". *Postharvest biology and Technology*, 19: 103 -110

- El-Gaouth, A.; Smilanick, J.; Wisniewski, M.; Wilson, C.** (2000 b). "Improved Control of Apple and Citrus Fruit Decay with a Combination of *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-Glucose". *Plant Disease*, 84, (3):249 - 253
- El-Kazzaz, M.; Sommer, N.; Fortlage, R.** (1983). "Effect of Controlled Atmospheres on Postharvest decay and quality of fresh strawberries". *Phytopathology* 73: 282 - 285
- Ewing, G.** (1978). "Cromatografía de Gases" en *Métodos Instrumentales de Análisis Químicos*. Ed. Mc Graw Hill de México, 388 – 410
- Falchi, E.** (2001). "Elaboración de Manuales de Procedimiento para mejorar la Calidad Comercial en Manzana, Pera y Durazno". (MGAP) – (PREDEG) – (DPAV). Programa de Mejoramiento de la Calidad Comercial de Frutas y Hortalizas para Consumo en Fresco. Montevideo, Uruguay.
- F. A. O.** (2003) <http://apps.fao.org/page/> Fecha de consulta: 30 de mayo 2003
- F.A.O.** (2002). **FAO Statistical Database.** http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp. Fecha de consulta: 20 /09/2002
- F.A.O.** (2003). Frutas. <http://www.fao.org/docrep/T0073E/T0073E07.htm#Fruits> Fecha de consulta: 1º de Junio 2003
- F.A.O.** (1989). "Prevention of postharvest food losses: fruits, vegetables and root crops". *FAO Training Series N° 17/2*. Food and Agriculture Organisation of United Nations, Rome, Italy
- Fennema, O.** (2000). "Química de los Alimentos. Fisiología y Manipulación de Frutas y Hortalizas. Postrecolección". Ed. Acribia, 1143 -1210
- Fidler, P.** (1968). "The metabolism of acetaldehyde by plant tissues". *J. Exp. Bot.* 19, 41 - 51
- Fishman, S.; Rodov, V.; Peretz, J.; Ben-Yehoshua, S.** (1995). "Model for Gas Exchange Dynamics in Modified-Atmosphere Packages of Fruits and Vegetables". *Journal of Food Science*, 60 (5): 1078 – 1083
- Finney, E.** (1971). "Dynamic elastic properties and sensory quality of apple fruit". *Journal of Texture studies*, 2: 62-74

- Fito, P.** (2002). "Desarrollo de un Nuevo Sistema de Aplicación de Recubrimientos en Cítricos". Departamento de Tecnología de Alimentos. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Flanzy, C.** (1999). "Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos". Ed. Mundiprensa.
- Fonseca, S.; Oliveira, F.; Brecht, J.** (2002). "Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review". *Journal of Food Engineering*, 52: 99 - 119
- Forcier, F.; Raghavan, G. S.; Gariepy, Y.** (1987). "Electronic Sensor for the Determination of Fruit and Vegetable Respiration". *Int. J. Refrig.* 10: 353 - 357
- Franco, J.** (2002). "El futuro de los mercados cítricos". En: *La Citricultura Mundial: Análisis y Perspectivas*. Ed. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, España, Valencia, 28 – 31 Octubre, 2002. Tomo II: 27 – 40
- Funebo, T.; Ahrné, L.; Kidman, S.; Langton, M.; Skjoldebrand, C.** (2000). "Microwave heat treatment of apple before dehydration-effects on physical properties and microstructure". *Journal of Food Engineering*, 46: 173-182
- García Segura, J.; Gavianes, J.; Martínez del Pozo, A.; Montero, F.; Oñaderra, M., Vivanco, F.** (1996). "Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica". Ed. Síntesis. Capítulo 6: 292-294
- García, J.; Ruiz-Altisent, M.; Barreiro, P.** (1995). "Factors Influencing Mechanical Properties and Bruise Susceptibility of Apples and Pears". *J. Agric. Engng Res.*, 61: 11 – 18
- Gibson, A.; Bratchell, N.; Roberts, T.** (1988). "Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature". *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 155 - 178
- Gil, J.; Veyrat, P.** (1971). "La naranja Navelate: origen, características y difusión". VIII Congreso del CLAM.
- Gmitter, F.; Hu y Jr, X.** (1990). "The possible role of Yunnan, China in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae)". *Economic Botany*, 44: 267 - 277

- González-Candelas, L., Veyrat, A., López-García, B., Marcos, J.** (2001). "Aplicación de agentes de biocontrol y péptidos antifúngicos como alternativas para el control de las podredumbres de la postrecolección de frutos cítricos". Levante Agrícola. Especial Postcosecha, 145 – 152
- González Vargas, L.** (2004). "Una Introducción a los Autómatas Celulares". <http://yupana.autonoma.edu.co/publicaciones/yupana/005/autocelular/Automatas.html> Fecha de consulta: 16 de noviembre de 2004.
- Goupy, P.; Amiot, M.; Richard-Forget, F.; Duprat, F.; Aubert, S.; Nicolas, J.** (1995). "Enzymatic browning of model solutions and apple phenolic substrates by apple polyphenoloxidase". Journal of Food Science, 60, 497
- Graell, J.; Fuentes T.; Echeverría, G.; López, M.** (2004). "Calidad de manzanas "Mondial Gala[®]" durante su evolución en campo y en cámara frigorífica. Efecto de la tecnología de frigoconservación". Maturacao e Pos-Colheita 2004. Frutos e Horticolas. Oeiras, Portugal, 2004. IV Simposio Ibérico; I Nacional; VII Espanhol. Pp.: 337 - 341
- Gravina, A.** (2003). "Proyecto de Citrus en el Uruguay del año 1999". Facultad de Agronomía. Departamento de Postcosecha. Universidad de la República Oriental del Uruguay. Comunicación Personal.
- Guardiola Bárcena, J.** (1995). Biología Vegetal. Clase Magistral de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia.
- Guardiola Bárcena, J.** (1999). "Componentes nutritivos de la naranja". En *Simposio Naranja y Salud, noviembre 1994*. Eds. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. Consellería de Agricultura Pesca y Alimentación, 143 – 162
- Guardiola, J.** (1995). "Biología Vegetal". Clase magistral de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia.
- Harris, J.; Stocker, H.** (1998). "Spherical Segment (Spherical Cap)".§4.8.4. In "Handbook of Mathematics and Computational Science". New York: Springer-Verlag, Pp.: 107

- Hasegawa, Y.; Yano, M.; Iba, Y.; Makita, Y.; Konakahara, M.** (1989). "Factors deteriorating the quality of Satsuma mandarin fruit on the packing house line and their improvement". Bulletin of the fruit tree Research Station, B Okitsu, Japón, 16: 29 – 40
- Hertog, M.; Boerrigter, H.; van den Boogaard, G.; Tijskens, L.; van Schaik, A.** (1999). "Predicting keeping quality of strawberries (cv. "Elsanta") packed under modified atmospheres. An integrated model approach". Postharvest Biology and technology, 15: 1 - 12
- Hirai, M.; Ueno, I.** (1977). "Development of citrus fruits: Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue". Plant and Cell Physiology, 18: 791 - 799
- Holme, D.; Peck, H.** (1983). "Bioquímica analítica". Ed. Acribia. S.A.
- HP M Series Micro Gas Chromatograph, User 's Manual** (1998). HP Part N°. DOC-2050. First Edition, May, 1998, Printed in USA. Little Falls Site Hewlett-Packard Company 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808-1610
- Hussein, A.** (1944). "Respiration in the Orange: A Study of Responsible for Oxygen Uptake." J. Biol. Chem., 155: 201-211
- Hutchings, J.** (1999). "Food Color and Appearance". Aspen Publishers, Inc. Pp.: 252 – 256
- Hyde, G.** (1997). "Bruising-Impacts, Why Apples Bruise, and What You can do to Minimize Bruising". Washington State University - Tree Fruit Postharvest Journal, 8 (4): 9 – 12
- IES, Las Galletas** (2004). "El Metabolismo". Departamento de Ciencias Naturales. <http://www.educa.rcanaria.es/usr/iesgalletas> Fecha de la Consulta, 20 de octubre del 2004.
- IFPSC** (2004). <http://www.cstl.nist.gov/FluidSimulationChallenge>. Fecha de consulta: 1º de junio 2004
- Infoagro** (2003) <http://www.infoagro.com/citricos/naranja.htm> Fecha de consulta: 29 de mayo 2003

- Infoagro** (2003). El cultivo de las Naranjas. <http://www.infoagro.com/citricos/naranja.htm> Fecha de consulta: 14 de Junio 2003
- Ingaramo, E.; Cayré, M.; Garro, O.** (2002). "Influencia de la acidez y concentración de NaCl sobre el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*". <http://www.UNNE.EDU.AR/CYT/2002/08-EXACTAS/E-005.pdf> Consulta realizada el 06/11/03
- Ippolito A., El Ghaouth, A., Wilson, C. L., Wisniewski, M.** (2000) "Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses". Postharvest Biology and Technology, 19: 265 –272
- Irving, D.; Joyce, D.** (1995). "Sucrose supply can increase longevity of broccoli (Brassica oleracea) branchlets kept at 22°C". Plant Growth Regulation, 17: 251 - 256
- Jackson, M.; Herman, B.; Goodenough, A.** (1982) Plant Cell Environ. 5: 163
- Jiménez, S.; Caballero, P.** (1996). "La producción y el comercio mundial de agrios". Fruticultura Profesional, 81: 8 - 19
- Juste, F.; Moltó, E.** (2002). "Innovación y tecnología aplicada a las frutas y hortalizas". En: *Jornadas Frutas y Hortalizas, del campo a la mesa*. Ed.: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados bajo Patronazgo de la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Depósito Legal: V-1124-2003
- Kader, A.** (1987). "Respiration and gas exchange of vegetables" En: J. Weichmann (Ed.). *Postharvest Physiology of Vegetables*. New York, USA: Marecl Dekker, Pp.: 25 - 43
- Kader, A.** (1986). "Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables". Food Technol. 40 (5): 99 – 100; 102 – 104
- Kader, A.** (1985). "Ethylene – Induced Senescence and Physiological Disorders in Harvested Horticultural Crops". Postharvest Technology of Horticultural Crops, 20 (81): 54 - 57
- Kahl, G.** (1978). "Biochemistry of Wounded Plant Tissues". Kahl, G. (Ed.). Walter de Gruyter, New York, 680p.

- Kays, S.** (1991). "Postharvest Physiology of Perishable Plant Products". AN A VI BOOK. Van Nostrand Reinhold.
- Kim, D.; Smith, N.; Lee, C.** (1993a). "Apple cultivar variations in response to heat treatment and minimal processing". *Journal of Food Science*, 58: 1111 - 1114
- Kim, D.; Smith, N.; Lee, C.** (1993b). "Quality of minimally processed apple slices from selected cultivars". *Journal of Food Science*, 58: 1115 – 1117
- Kiyosawa, K.** (1975). "Studies on the effects of alcohols on membrane water permeability of Nitella". *Protoplasma*, 86: 243 - 252
- Klotz, L.** (1973). *Color Handbook of Citrus Diseases*. En: Library of Congress Catalogue Card N°. 73-620140. USA. Citrus Research Center and Agricultural Experiment Station. Riverside, California 92502
- Knee, M.** (1991). "In plant life under oxygen deprivation: Ecology; Physiology and Biochemistry". Ed. By M. B. Jackson, D. D. Davies; H. Lambers (SPB, The Hague). Pp.: 229
- Knee, M.; Bartley, I.** (1981). "Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits". In *Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables* (eds. J. Friend and M.J.C. Rhodes), Academic Press, London, Pp.: 133 - 148
- Labuza, T.; Fu, B.; Taoukis, P.** (1992). "Prediction for shelf life and safety of minimally processed CAP/MAP chilled foods: a review". *J. Food Prot.* Pp.: 55 - 74
- Lafuente, M^a;** **Fernando A.;** **Sánchez-Ballesta, M^a;** **Sala, J.;** **Mulas M.;** **Zacarías, L.** (2001). "Alteraciones fisiológicas durante la postcosecha de frutos cítricos: tratamientos de control y mecanismos implicados". *Levante Agrícola. Especial Postcosecha*, 128 – 133
- Labavitch, J.; Greve, L.; Mitcham, E.** (1998). "Fruit Bruising: It 's More than Skin Deep". Department of Pomology, UCD. *Perishables Handling Quarterly* Issue N° 95, 7 - 9
- Laurila, E.; Kervinen, R.; Ahvenainen, R.** (1998). "The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits". *Postharvest news and information*, 9 (4): 53 -66

- Lee, J.** (1987). "The design of controlled or modified packaging systems for produce". In Food Product-Package Compatibility, Proceedings, Ed. J. I. Gray, B. R. Harte & J. Miltz. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, Pp.: 157 - 69
- Lee, D., Hagggar, P., Lee, J.; Yam, K.** (1991). "Model for Fresh Produce Respiration in Modified Atmospheres Based on Principles of Enzyme Kinetics". Journal of Food Science, 56 (6): 1580 - 1585
- Lee, D., Song, Y.; Yam, K.** (1996). "Application of an Enzyme Kinetics based on a Respiration Model to Permeable System Experiment of Fresh Produce". Journal of Food Engineering, 27: 297 - 310
- Lee, H., Chung, H., Kang, J., Chung, S., Choi, J.** (1997). "A Respiration Rate Measurement of Fresh Fruits and Vegetables with a Corrected Pressure Variation Method". Korean Journal. of Food Science and Technology, 29 (6): 1119-1124
- Liao, M.; Liu, M.; Yang, J.** (1982). "Respiration Measurement of some Fruits and Vegetables of Taiwan. II". Research Report, Food Industry Research and Development Institute, No. E, Pp.: 66: 18
- Linton, R.; Carter, W.; Pierson, M.; Hackney, C.** (1995). "Use of modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A". J. Food Prot., 9: 946 – 954
- Linton, R.; Carter, W.; Pierson, M.; Hackney, C.; Eifert, J.** (1996). " Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula". J. Food Prot., 59: 16 - 23
- Longheed, E.; Franklin, E.** (1975). "Air Flow Rates Influence CO₂ Production of Apple Fruits, Potato Tubers, and Onion Bulbs". HortScience, 104: 388-390
- López Fernández, J.** (1995). "La naranja, composición y cualidades de sus zumos y esencias". Generalitat Valenciana, Pp.: 46
- López García, B.; González-Candelas, L.; Pérez-Payá, E.; Marcos, J.** (2000). "Identification and Characterization of a Hexapeptide with Activity Against Phytopathogenic Fungi That Cause Postharvest Decay in Fruits". Molecular Plant-Microbe Interactions, 13 (8): 837 – 846

- López Ocaña, L.** (2004). Responsable de Hongos Filamentosos. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Comunicación Personal. Fecha de Consulta: 23 de marzo del 2004.
- Loussert, R.** (1992). "Los Agrios". Ediciones Mundi-Prensa, Pp.: 50
- Lu Arpaia, M.; Kader, A.** (2000). "Recomendaciones para preservar la calidad postcosecha de los cítricos". *Levante Agrícola, Especial Poscosecha*, 352: 239-243
- Lyons, J.** (1973). "Chilling Injury in Plants". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24: 445 – 466
- Maarabi, M.** (2004). "Mención sobre el *Etrog (Citrus medica L.)* en la Biblia; *Talmud* de Jerusalén y *Talmud* de Babilonia". Comunicación personal del Dr. Mordejai Maarabi, Gran Rabino de la Comunidad Israelita del Uruguay. Fecha de consulta: 6 de noviembre de 2004.
- Mannapperuma, J.; Singh, R.** (1992). "Modeling of Gas Exchange in Polymeric Packages for Fresh Fruits and Vegetables". In: *Process Optimisation and Minimal Processing of Foods*, R. P. Singh y F. Olivera, (Ed). Elsevier, New York. Pp.: 437-445
- Manual de Prácticas:** "Medio Saubouraud para cultivo de hongos". http://edicion-micro.usal.es/web/educativo/micro2/manual_practicas/manualpracticas.htm
! Consulta realizada el 17 de marzo del 2004
- Martínez-Jávega, J.; Cuquerella, J.; Del Río, M.; Navarro, P.** (1994). "High temperature conditioning of "Fortune" mandarins to reduce chilling injury during low temperature storage" in *Proc. Contribution du Froid a la preservation de la qualité des fruits, légumes et produits halieutiques. Actas del Symposium. Fes (Maroc). Chapitre 8:87-92.* Ed. Del Symposium: A. Lahman Bennani and P. Messalho, Fes (Maroc).
- Martínez-Jávega, J., Cuquerella J., Del Río, M., Navarro, P.** (1999). "Experiencias de Tecnología Postcosecha para la Exportación de Cítricos Españoles". *Todo CITRUS* (6): 5 – 14
- Martínez Navarrete, N.; Andrés Grau, A.; Chiralt Boix, A.; Fito Maupoey, P.** (1998). "Termodinámica y Cinética de Sistemas Alimento Entorno".

Departamento de Tecnología de Alimentos. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. Servicio de Publicaciones. Pp.: 118; 353

Mastrocola, D.; Lerici, C. (1991). "Colorimetric measurements of enzymatic and non-enzymatic browning in apple purees". *International Journal of Food Science*, 3: 219 - 229

Mathooko, F. (1996). "Regulation of Respiratory Metabolism in Fruits and Vegetables by Carbon Dioxide". Review. *Postharvest Biology and Technology*, 9: 247 – 264

Mauseth, J. (1995). "Botany, An Introduction to Plant Biology". 2nd Edition. Saunders College Publishing. Pp.: 300

Mayer, A. (1987). "Polyphenol oxidases in plants: recent progress". *Phytochemistry*, 26 (1): 11 - 20

Mazzuz, C. (1996) "Calidad de los frutos cítricos". Ediciones de Horticultura S. L.; Reus, España.

McCollum, T.; Mc Donald, R. (1991). "Electrolyte Leakage, Respiration, and Ethylene Production as indices of Chilling Injury in Grapefruit". *HortScience* 26 (9): 1191 – 1192

McGlasson, W. (1992). "Modified Atmosphere Packaging, Matching Physical Requirements with Physiology of Produce". *Food Aust.*, 44: 168-186

McLaughlin, C.; O'Beirne, D. (1999). "Respiration Rate of a Dry Coleslaw Mix as Affected by Storage Temperature and Respiratory Gas Concentrations". *Journal of Food Science*: 64 (1): 116-119

Melián-Navarro, A. (2000). "Tendencias Productivas y Comerciales de la Citricultura Española". *Todo CITRUS* 9 (abril / junio), 31 – 39

Menesatti, P.; Paglia, G. (2001). "Development of a Drop Damage Index of Fruit Resistance to Damage". *J. Agric. Engng Res.*; 80 (1): 53 - 64

Millerd, A.; Scott, K. (1962). "Respiration of the Diseased Plant". *Annu. Rev. Plant Pathol.* 13, 550 - 574

Mitcham, E.; Crisosto, C. H.; Kader, A.
<http://rics.ucdavis.edu/postharvest2/Produce/Producefacts/Fruit/> (Consulta realizada el 28 de agosto del 2004).

- Mizrach, A.** (2001). "Measurements of mechanical and physiological attributes of plum fruit using ultrasonic method" en http://www.atb-Postdam.de/SYMPOSIUM2001/content/Abstracts/Pre_Abtstracts.html
- Mohr H.; Schopfer, P.** (1995). "Respiratory Metabolism" in *Plant Physiology*. Eds. Springer-Verlag. Pp.: 188 –219
- Mohsenin, N.** (1981). "Physical properties of plant and animal materials". Gordon and Breach Science Publishers. New York, London, Paris.
- Moltó García, E.; Blasco, J.** (2002). "Desarrollo de dispositivos automáticos para la gestión integral de la inspección del producto en las centrales hortofrutícolas". Levante Agrícola. Especial Postcosecha. Pp.: 229 – 237
- Moltó, E.; Selfa, E.; Ferriz, J.; Conesa, E.; Gutiérrez, A.** (1999). "An Aroma Sensor for Assesing Peach Quality". *Journal Agricultural Engineering Research*, 72, 311 - 316
- Moltó-García, E.** (2004). "Cálculo de la energía de impacto en frutas en líneas de confección". Comunicación personal.
- Monk, L.; Braendle, R.; Crawford, R.** (1987). *J. Exp. Bot.* 38: 233
- Monsalve-González, A.; Barbosa-Cánovas, G.; Cavalieri, R.; McEvily, A.; Iyengar, R.** (1993). "Control of browning during storage of apple slices preserved by combine methods, 4-hexylresorcinol as antibrowning agent". *Journal of Food Science*, 58: 797 - 800
- Mori, T.; Muraoka, N.; Tamura, T.** (1985). "An automatic system for determining respiration of fruits and vegetables using infra-red gas analyser". Report of the National Food Research Institute (Shokuryo-Kenkyusho-Kenkyu-Hokoku). 46: 162-170
- Morris S.; Nicholls, P.** (1978). "An Evaluation of Optical Density to Estimate Fungal Spore Concentrations in Water Suspensions". *Phytopathology*, 68: 1240 - 1242
- Morrow, C.; Mohsenin, N.** (1996). "Considerations of selected agricultural products as viscoelastic materials". *Journal of Food Science*, 31: 686-698
- Nakamura, R. Ito; Inaba, A.** (1977). "Effect of vibration on the respiration of fruits. 2. Effects of vibration on the respiration rate and quality of tomato fruit during ripening after vibration". *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 46: 349 – 360

- Neira, M.; Rodríguez, H.** (1999). "Microbiología Predictiva". *Énfasis*, Año 5, 4:22 - 28
- Nisperos-Carriedo, M.; Shaw, P.** (1990). "Comparison of volatile flavor components in fresh and processed oranges juices". *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1048 – 1052
- Norman, S.** (1977). "The role of volatiles in storage of citrus fruits". *Proc. Int. Soc. Citriculture*, Vol. I: 238 – 242
- Norman, S.; Craft, C.** (1971). "Production of ethanol, acetaldehyde, and methanol by intact oranges during and after nitrogen storage". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 96: 464 – 467
- Norrish, R.** (1966). "An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups". *J. Food Technol.*, 1:25
- Oomens, J.; Zuckermann, H.; Persijn, S.; Parker, D.; Harren, F.** (1998). "CO₂- laser-based photoacoustic trace-gas detection: applications in postharvest physiology". *Appl. Phys. B* 67: 459 - 466
- Ortiz-Cañavate, J.; García-Ramos, F.; Homer, I.; Ruiz-Altisent, M.** (2001). "Determination of firmness in a fruit packing line using a non destructive impact sensor" en http://www.atb-Postdam.de/SYMPOSIUM2001/content/Abstracts/Pre_Abtstracts.html
- Ortiz-Cañavate, J.; García-Ramos; Ruiz-Altisent, M.** (2001). "Characterization of a Right Angle Transfer Point in a Fruit Packing Line". *J. Agric. Engng. Res.*, 79 (2): 205 – 211
- OSHA** (2001) (Occupational Safety & Health Administration) U.S. Department of Labor <http://www.osha-slc.gov/dts/sltc/methods/organic/org100/org100.html> Fecha de consulta: 08/05/2001
- Palou, L.; Smilanick, J.; Crisosto, C.; Mansour, M.** (2001). "Effect of Gaseous Ozone Exposure on the Development of Green and Blue Molds on Cold Stored Citrus Fruit". *Plant Disease*, 85, (6): 632 - 638
- Palou, L.; Smilanick, J.; Usall; Viñas, I.** (2001). "Control of Postharvest Blue and Green Molds of Oranges by Hot Water, Sodium Carbonate and Sodium Bicarbonate". *Plant Disease*, 85 (4): 371 – 376

- Pao, S; Brown, G.** (1998). "Reduction of Microorganisms on Citrus Fruit Surfaces during Packinghouse Processing". *Journal of Food Protection*, 61, (7): 903 - 906
- Park, H.; Rhim J.; Lee H.** (1996). "Edible Coating Effects on Respiration Rate and Storage Life of "Fuji" Apples and "Shingo" Pears. *FOODS AND BIOTECHNOLOGY*, 5 (1): 59 – 66
- Park, J.; Chun, J.; Lee, S.; Kim, K.** (1989). "[Automatic Measurement of Respiration Rate and Weight Loss during Storage of Citrus Fruit." *Korean Journal of Food Science and Technology*, 21 (3): 387-390
- Parker, M.; Wardoswki, W.; Dewey, D.** (1984). "A Damage Test for Oranges in a Commercial Packing House Line". *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 94: 136 – 137
- Paz, O.; Janes, H.; Prevost, B.; Frenkel, C.** (1981). "Enhancement of Fruit Sensory Quality by Post-harvest Applications of Acetaldehyde and Ethanol". *Journal of Food Science*, 47: 270 - 276
- Perata, P.; Alpi, A.** (1991). *Plant Physiol.* 95: 748
- Pérez, V.** (1989). "Química De Las Disoluciones. Diagramas y Cálculos Gráficos". Ed. Alambra. Pp.: 135
- Perucho, R.; Tuset, J. J.** (2003). "Hongos causantes del podrido de nuestras naranjas en las últimas campañas de comercialización". *Levante Agrícola. Especial de Postcosecha*, 220 – 226
- Perucho, R.; Tuset, J.** (2002). "Resistencias de los hongos *Penicillium* a los fungicidas empleados en la postcosecha de los frutos cítricos". *Levante Agrícola. Especial de Postcosecha*, 252 – 257
- Perucho, R.; Tuset, J.** (2001). "Hongos causantes del podrido en clementinas y mandarinas en postcosecha". *Levante agrícola. Especial Postcosecha*, 201-106
- Pesis, E; Avissar, I.** (1989). "The post-harvest quality of orange fruits as affected by pre-storage treatments with acetaldehyde vapour or anaerobic conditions". *J. Hort. Sci.* 64: 107 – 113

- Pesis, E.; Marinansky, R.** (1990). "Volatile Production induced by *Penicillium digitatum* in Orange Fruit and in Culture". J. Phytopathology, 128: 306 – 314
- Pesis, E.; Marinansky, R.** (1993). J. Plant. Physiol. 142: 717
- Pesis, E.; Ng, T.** (1984a). "The role of anaerobic respiration in germinating muskmelon seeds. I. In relation to seed lot quality". J. Exp. Bot., 35: 356 – 365
- Pesis, E.; Ng, T.** (1984b). "The role of anaerobic respiration in germinating muskmelon seeds. II. Effect of anoxia treatment and alcohol deshydrogenase activity". J. Exp. Bot., 35: 366 -372
- Pino J., Tapanes; R., Rosado, A.; Baluja, R.** (1986a). "Análisis of Volatile Components in Valencia Orange Juice from Cuba". Acta Aliment., 15: 291- 297
- Pino, J.; Torricella, R.; Orsi, F.** (1986b). "Correlation between Sensory and gas – Chromatographic Measurements on Grapefruit Juice Volatiles". Die Nahrung 30:783 – 790
- Pitt, J.** (1979). "The Genus *PENICILLIUM* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*". Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. Division of Food Research, North Ryde, N.S.W. 2113, Australia. Academic Press, 16 –23; 24 – 27; 380 – 387
- Plaza, P.; Usall, J.; Torres, R.; Lamarca N; Asensio, À., Viñas, I.** (2003). "Control of green and blue mould by curing on oranges during ambient and cold storage". Postharvest Biology and Technology, 28: 195 - 198
- Polevaya, Y., Alkalai – Tuvia, S., Copel, A. Fallik, E.** (2002). "Early Detection of Grey Mould Development in Tomato after Harvest". Postharvest Biology and Technology, 25: 221 – 225
- Porat, R., Daus, A., Weiss B., Cohen, L., Fallik, E., Droby, S.** (2000). "Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by short hot water brushing treatment". Postharvest Biology and technology, 18: 151-157

- Primo, J.; Salvador, M. L.; Oria, R.** (2001). "Respiration Rate of Sweet Cherries: "Burlat", "Sunburst" and "Sweetheart" Cultivars". *Journal of Food Science*, 66 (1): 43 -47
- Primo-Yúfera, E.** (1997). "Química de los Alimentos". Ed. Síntesis, Madrid, España.
- Prothon, F.; Ahrné, L. M.; Funebo, T.; Kidman S.; Langton, M.; Sjöholm, I.** (2001) "Effects of combined osmotic and microwave dehydration of apple on texture, microstructure and rehydration characteristics". *Lebensm-Wiss. U-Technol.*, 34: 95-101
- Quesada, M. A.; Valpuesta, V.** (2000). "Juvelinidad, Senescencia y Abscisión" en "Fundamentos de Fisiología Vegetal". Joaquín Azcón-Bieto; Manuel Talón. McGraw-Hill Interamericana. UBE. Edicions Universitat de Barcelona. Pp.: 451 - 464
- Ragni, L.; Berardinelli, A.** (2001). "Mechanical behaviour of apples and damage during sorting and packaging". *J. Agric. Enging. Res.*, 78(3): 273-279
- Ramírez, C.** (1982). "Manual and Atlas of the Penicillia". Elsevier Biomedical Press. Pp.: 3 - 13; 374 – 377; 475 – 479; 665 – 669; 740; 757
- Ribero, C.; Orlando, M.; Silva, A.** (2004). "Determinacao da data de colheita de macas". *Maturacao e Pos-Colheita 2004. Frutos e Hortícolas. Oeiras, Portugal, 2004. IV Simposio Ibérico; I Nacional; VII Espanhol.* Pp: 57 - 61
- Rocha, A.; Morais, A.** (2003). "Shelf life of minimally processed apple (cv. Jonagored) determined by colour changes". *Food Control*, 14: 13 – 20
- Roe, B.; Davis, O.; Bruemmer, J.** (1984). "Pyruvate metabolism during maturation of Hamlin oranges". *Phytochemistry*, 23: 713 - 717
- Rolle, R.; Chism, G.** (1987). "Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables". *Journal of Food Quality*, 10: 157 - 177
- Roos, T.; McMeekin, T.** (1994). "Predictive microbiology". *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 241 – 246
- Rosenthal, A. J.** (2001). "Textura de los alimentos. Medida y percepción". Ed. Acribia, S.A.

- Saltveit, M. Jr.; Locy, R.** (1982). "Cultivar differences in ethylene production by wounded sweet potato roots". J. Amer. Soc. Hort. Sci., 107: 1114 - 1117
- Sapers, G.; Douglas Jr., F.** (1987). "Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and un juice of raw apple and pear fruits". Journal of Food Science, 57: 1192 - 1193
- Sastre Gallego, A.** (1999). "Transporte y Metabolismo de la Vitamina C". En "Simposio Naranja y Salud, noviembre 1994". Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. Consellería de Agricultura Pesca y Alimentación, 133 -142
- Scerra, V.; Caridi, A.; Foti, F; Sinatra, M.; Caparra, P.** (2000). "Changes in chemical composition during the colonisation of citrus pulps by a dairy *Penicillium roqueforti* strain". Bioresource Technology, 72: 197 - 198
- Schirra, M.** (1992). "Behaviour of "Star Ruby" grapefruits under chilling and non-chilling storage temperature". Postharvest Biology and Technology, 2: 315 - 327
- Schiffmann- Nadel, M.** (1977). "Chemical and Physiological Changes in Citrus Fruit during Storage and their Relation to Fungal Infection". Proc. Int. Soc. Citriculture, 1: 311 – 317
- Schulte, N.; Brown, G.; Timm, E.** (1992). "Apple impact damage thresholds". Applied Engineering in Agriculture, 8 (1): 55-60.
- Segura, M.** (2001). Influencia del encerado sobre la actividad respiratoria en los frutos cítricos. Trabajo Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Sekse, L.** (1988). Storage and Storage Potential of Sweet Cheeries (*Prunus avium* L.) as related to Respiration Rate. Acta Agriculturae Scandinavica: 38 (1): 59-66
- Shiomi, S.; Wamocho, L.; Agong, S.** (1996). Ripening Characteristics of Purple Passion Fruit on and off the Vine. Postharvest Biol. Tech. 7: 161 - 170
- Spiegel-Roy, P. Goldschmit, E.** (1996). Biology of Citrus. Biology of Horticultural Crops. Cambridge University Press (UK).

- Shaw, P.; E.; Rouseff, R.; Goodner, K.; Bazemore, R.; Nordby H.; Widmer, W.** (2000). "Comparison of Headspace GC and Electronic Sensor Techniques for Classification of Processed Orange Juices". *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 33: 331 – 334
- Shmulevich, I.; Galili N.; Yachaeli, R.** (2001). "Firmness assesment of mango fruit using mechanical nondestructive techniques" en http://www.atb-Postdam.de/SYMPOSIUM2001/content/Abstracts/Pre_Abtstracts.html
- Sholberg, P.** (1998) "Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay". *Plant Disease*, 82, 6, 689-693
- Schotsmans, B.; Verlinden, J.; Lammertyn, J; Nicolai, B.** (2003). "Simultaneous Measurement of Oxygen and Carbon Dioxide Diffusivity in Pear Fruit Tissue". *Postharvest Biology and Technology*, 29, (2): 155 - 166
- Silva, F.** (2004). Comunicación Personal del Sr. Fernando Silva, encargado principal del Frigorífico Modelo de Montevideo, Uruguay. Fecha de la Consulta: 23 de Setiembre del 2004.
- Siyami, S.; Brown, G.; Burgess, G.; Gerrish, J.; Tennes, B.; Burton, C.; Zapp, R.** (1988). "Apple impact bruise prediction models". *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 31, (41): 1038 - 1046
- Skinner, G.; Larkin, J.** (1994). "Mathematical modelling of microbial growth". *Journal of Food Safety*, 14: 175 - 217
- Smanatova, S.; Nedbal, L.; Trtílek, M.; Jegorov, A.** (2001). "Fluorescence imaging as a non-invasive diagnostic tool for fungal stress detection ins strawberry plants" en http://www.atb-Postdam.de/SYMPOSIUM2001/content/Abstracts/Pre_Abtstracts.html
- Smilanick, J.; Sorenson, D.; Mansour, M.; Aiemyabei, J.; Plaza, P.** (2003). "Impact of a Brief Postharvest Hot Water Drench Treatment on Decay, Fruit Appearance, and Microbe Populations of California Lemons and Oranges". *HorTechnology*, 13, (2): 333 - 338
- Soukupová, J.; Nedbal, L.; Trtílek, M.; Jegorov, A.** (2001). "In vivo fluorescence imaging as a tool for early detection of fungal infection of

lemon fruits” en http://www.atb-Postdam.de/SYMPOSIUM2001/content/Abstracts/Pre_Abtracts.html

Stanley, J. (1991). *Postharvest Physiology of Perishable Plant Products*. Ed.: Van Nostrand Reinhold.

Stern, D.; Ortolá, M. D.; Fito, P. (2001). Estudio de la influencia de distintas condiciones de almacenamiento de cítricos sobre el desarrollo de componentes volátiles indeseables y predicción de su vida útil. En: “*Series de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Investigación del Postgrado del IIAD-DTA. AÑO 2000. Vol. I*”. Eds.: P. Fito; A. Chiralt; A. Andrés; N. Martínez-Navarrete, 159 – 176

Swing, G. (1978). “Métodos Instrumentales de Análisis Químicos”. Ed. McGraw Hill de México. Capítulo. 19: 388 – 410

Tadeo, F. (2000). “Fisiología de las Plantas y el Estrés” en “Fundamentos de Fisiología Vegetal”, McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. y Edicions Universitat de Barcelona Pp.:481 - 498

Taiz, L.; Zeiger, E. (1998). "Plant Physiology". Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Timoshenko, S.; Goodier, J. (1951). “Teoría de la elasticidad”. Ed. McGraw-Hill, N.Y.

Tucker, G. (1993). “Biochemistry of Fruit Ripening”. Seymour G. B.; Taylor, J. E.; Tucker, G. A., Editors. Chapman y Hall, Pp.: 1 - 51

Tuset, J. (1987). "Podredumbres de los Frutos Cítricos". Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Generalitat Valenciana. Consellería de Agricultura y Pesca.

Tuset, J., Hinarejos, C.; Mira, J. (2000). "Eficacia de los tratamientos postcosecha tolerados en producción integrada en el control de *Penicillium digitatum* y *Botrytis cinerea*". Levante agrícola. Especial Postcosecha, 210 – 214

Tuset, J., Hinarejos, C.; Mira, J. (1997). "Enfermedades fúngicas de la postrecolección de los agrios actualmente en progreso".Phytoma España. (90): 69 – 76

- Uritani, I.; Asahi, T.** (1980). "Respiration and related metabolic activity in wounded and infected tissue". In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 2, D. D. Davis (Ed.). Academic Press, New York, Pp.: 463 - 485
- U.S. EPA.** (1994). "U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) Online.Coversheet for Acetaldehyde". Office of Health and Environmental Assessment, U.S. EPA, Cincinnati, OH, Retrieved 7/94.
- Vakis, N., Grierson W.; Soule, J.** (1970). "Chilling Injury in Tropical and Subtropical fruits III. The Role of CO₂ in Suppressing Chilling Injury of Grapefruit and Avocados". *Proc. Trop. Reg. Amer. Soc. Hort. Sci.* 14: 89 - 100
- Valcárcel Cases, M; Gómez Hens, A.** (1994). "Técnicas Analíticas de separación". Ed. Reverté. Capítulo 19: 615 – 654
- Valencia Fruits–Agrocomercio-Redacción** (2004), (a). "Exportadas 656.178 toneladas de cítricos a países terceros". 11 de mayo del 2004 (www.valenciafruits.com)
- Valencia Fruits–Agrocomercio-Redacción** (2004), (b). "Importación Citrícola de Países Terceros. 1.943.464 kilos al 6 de mayo". 11 de mayo del 2004 (www.valenciafruits.com)
- Valero, C.; Ruiz–Altisent, M.** (2000). "Design guidelines for a quality assessment system of fresh fruits in fruit centers and hypermarkets". *Agricultural Engineering International: the CIGR-ejournal*, Bonn, Germany: The Commission of Scientific Research and Development, 1999 - 2000". Vol. II, Pp.: 1 – 20
- Valero-Ruiz, E.** (1993). "Caracterización cinética de la polifenol oxidasa de uva Airen". Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla–La Mancha.
- Van den Boogaard, R.; Ruijsch, J.** (2001). "Products diagnostics and process control" en http://www.atb-Postdam.de/SYMPOSIUM2001/content/Abstracts/Pre_Abtstracts.html
- Velásquez de la Cruz, G.; Martín, P.; Martínez, P.; Robles C.** (1998). "Efecto de Temperatura, Humedad Relativa y Empaque sobre la Respiración de Guayaba". *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2 (2): 54 - 59

- Vines, H.; Edwards, G.; Griergson, W.** (1965). "Citrus fruit respiration". Proceedings Florida State Horticultural Society, 78: 198 – 202
- Vines, H.; Grierson, W.; Eduardo, G.** (1989). "Respiration internal atmosphere and ethylene evolution of citrus fruits". Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 96, 227-234
- Viñas, I.** (1997). "Control biológico de las principales enfermedades fúngicas post-cosecha. Phytoma España, 90: 78 – 81
- Waks, J.; Chalutz, E.; Schiffmann-Nadel, M; Lomeniec E.** (1985). "Relationship among Ventilation of Citrus Storage Room, Internal Fruit Atmosphere, and Fruit Quality". J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 (3): 398 –402
- Wareham, P.; Chueh, H.; Persaud, K.; Payne, P.; Hartfield, J.** (2000). "Detection of Dry Rot in Timbers using a Hand-held Electronic Nose". Section 4: Medical/Microbial. Paper presented at the Seventh International Symposium on Olfaction and Electronic Noses, July 2000.
- Weber, J.; Reuter, W.; Lawton, H.** (1967). "History and development of the citrus industry". In: Reuther, W.; Webber, H.J. and Batchelor, L. D. (Eds.). The citrus industry. University of California Press, Riverside, Pp.: 1 – 39
- Wijtzes, T.; De Wit, J.; Huis int Veld, J.; Vant Riet, K.; Zwietering, M.** (1995). "Modelling Bacterial Growth of *Lactobacillus curvatus* as a Function of Acidity and Temperature". Appl. Environ. Microbiol., 61: 2533 – 2539
- Wilkinson, S.; Guanio, D.** (1998). "Development of a Spectrometric Citrus Odor Sensor for a Frugivorous Robot" en "Citrus Odor Sensing and Orange Batteries for a Frugivorous Robot", Master 's Degree Thesis, Mechanical Engineering, Dept., University of South Florida, Jan., 14, 1998, 79 pages
- Wills, R.; McGlasson, W.; Graham, D.; Joyce, D.** (1998). "Postharvest: An Introduction to the Physiology & Handling of Fruit, Vegetables & Ornamentals". CAB INTERNATIONAL.
- Wills, R.; Lee, T.; McGlasson, W.; Hall, E.; Graham, D.** (1984). "Fisiología y Manipulación de Frutas y Hortalizas. Postrecolección". Ed. Acribia.
- Whiting, R.** (1995). "Microbial Modeling in Foods". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35, (6): 467 - 494

- Woodward, J.; Topping, A.** (1972). "The influence of controlled atmospheres on the respiration rates and storage behaviour of strawberry fruits". *Journal of Horticultural Science*, 47: 547 – 553
- Zaragoza, S.** (1997). "Variedades de naranjas y mandarinas. Distribución comercial. Tendencias". *Phytoma España*, 90:17
- Zaragoza, S.; Agustí, M.** (2001). Spain. Regional Reports. Florida Growers, Mid-August: 20-22
- Zauberman, G.; Barkai-Golan, R.** (1975). "Changes in Respiration and Ethylene Evolution Induced by *Diplodia natalensis* in Orange Fruit". *Phytopathology*, 65: 216 – 217
- Zhang, W.** (1994). "Apple impact bruise analysis". Ph D. diss. Pullman, Wash.: Washington State University.
- Zhu, M.; Chu, C.; Wang, S.; Lencki, R.** (2001). "Influence of Oxygen, Carbon Dioxide, and Degree of Cutting on the Respiration Rate of Rutabaga". *Journal of Food Science*, 66 (1): 30 - 37