



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

“EFECTO DE LA APLICACIÓN POSCOSECHA DE UN RECUBRIMIENTO NATURAL Y ACEITES ESENCIALES EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE Y METABOLISMO SECUNDARIO DE AGUACATE (*Persea americana* MILL., CV. ‘HASS’) ORGÁNICO.”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

I.I.A. Ricardo Rodríguez Rivera

DIRIGIDA POR:

Dra. Dulce María Rivera Pastrana

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, DICIEMBRE DE 2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Efecto de la aplicación poscosecha de un recubrimiento natural y aceites esenciales en el sistema antioxidante y metabolismo secundario de aguacate (*Persea americana* Mill cv 'Hass') orgánico.

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:
Ricardo Rodríguez Rivera

Dirigido por:
Dra. Dulce María Rivera Pastrana

Dra. Dulce María Rivera Pastrana
Presidente


Firma

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Secretario


Firma

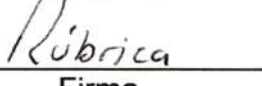
Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios
Vocal


Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente


Firma

M.C. Juan Antonio Herrera González
Suplente


Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros del laboratorio, por su apoyo y animación cotidianos.

A los doctores Dulce, Estela y Edmundo por su generosidad en consejos, ideas, paciencia y rigor.

Al grupo de poscosecha como conjunto, por ese peculiar compañerismo que hizo más divertido el trabajo y la colaboración. También a su amistad fuera de horarios.

A todos los integrantes de mi consejo por sus valiosas observaciones e ideas para mejorar el trabajo desde su planteamiento hasta su edición.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de Uruapan, Michoacán; especialmente al M.C. Juan Antonio Herrera, y a su asistente Saúl.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que hizo posible este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, por su infinito apoyo y cariño.

A mi abuelita, que me impulsó a iniciar este proyecto sin poder acompañarme hasta su fin (DEP).

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la supervisión de la Dra. Dulce M. Rivera Pastrana.

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un producto consumido en América desde la época prehispánica. México se posiciona como el mayor productor en el mundo, con una participación por encima del 90% en el mercado a nivel mundial. De acuerdo a la FAO la mayor pérdida de alimentos en la cadena de suministro se produce durante el manejo poscosecha, debido a diferentes factores que disminuyen la calidad y reducen la vida útil de los alimentos. Se ha reportado que el uso de ceras de origen natural y de aceites esenciales (AE) puede contribuir en gran medida en el mantenimiento de calidad y alargar la vida de anaquel en distintos frutos. En objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de un recubrimiento orgánico comercial (Natural Shine 505-OR®) combinada con aceites esenciales de orégano y tomillo a concentraciones de 3 y 5ml/l como recubrimiento; y se evaluó su efecto en la firmeza, pérdida de peso, color interno y externo; actividad enzimática de catalasa (CAT), peroxidasa (POD), superóxido dismutasa (SOD), lipoxigenasa (LOX) y fenilalanin-amonio liasa (PAL); y en el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como su relación con la actividad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el almacenamiento a 6°C durante 21 días. El uso de recubrimientos, con o sin AE, mostró una reducción en la pérdida de peso del 1.5%, y valores de firmeza 6 veces mayores respecto al control sin recubrimiento. Las actividades enzimáticas no presentaron una correlación positiva con el contenido de metabolitos secundarios o con la actividad antioxidante en frutos tratados. Sin embargo, los niveles de actividad antioxidante no presentaron pérdidas nominales a lo largo de la maduración en las condiciones de almacenamiento de este trabajo. El uso del recubrimiento natural contribuyó positivamente a la conservación de la calidad de aguacate orgánico y al mantenimiento de su actividad antioxidante.

(Palabras clave: aguacate; orgánico; recubrimientos; aceites esenciales; timol; carvacrol; actividad antioxidante; calidad poscosecha; enzimas antioxidantes)

ABSTRACT

The avocado (*Persea americana* Mill.) is a commodity highly consumed in America since pre-Hispanic age. Mexico is the major producer globally with the highest share in the organic market of tree fruits. Accordingly to FAO, the most critical food losses in supply chain have place between farm and fork, due to a lack of, or inadequate strategies oriented to preserve quality and prolong shelf life of vegetable products. Recent evidence support that the application of natural coatings or the use of essential oils (EO) could contribute significantly on preserving quality and extending shelf life of different crops during storage. The objective of this work was to evaluate the application of an organic coating (Natural – Shine 505-OR®) combined with oregano and thyme essential oils (3 and 5 ml/l). Firmness, weight, internal and external color, along catalase (CAT), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), lipoxygenase (LOX) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzymatic activities were assessed with total soluble phenols (TSP) and flavonoids (TSF), and its relation with antioxidant activity (DPPH and ABTS) during cold storage at 6°C for 21 days. The application of coatings, with or without EO, showed a 1.5% reduction of weight loss of 1.5%, 6 fold firmness values compared with fruits without natural coatings. No positive correlations of enzymatic activities with secondary metabolites like TSP and TSF or with antioxidant activity were observed in treated fruits using two different methods. Nevertheless, antioxidant capacity levels did not exhibited nominal reductions during storage at the reported conditions in this work. The application of natural coatings contributed positively to maintain quality parameters of organic avocado and its antioxidant activity.

(Key words: avocado; organic; coatings; essential oils; thymol; carvacrol; antioxidant activity; postharvest quality; antioxidant enzymes)

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
TABLA DE CONTENIDOS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 El aguacate orgánico.....	15
2.2 Taxonomía	16
2.3 Importancia comercial del aguacate orgánico.....	17
2.4 Problemas frecuentes durante el manejo poscosecha del aguacate orgánico ...	18
2.5 Actividad del sistema enzimático antioxidante	20
2.6 Recubrimientos.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
5. METODOLOGÍA.....	28
5.1 Diseño Experimental.....	28
5.2 Aplicación de recubrimientos.....	30
5.3 Análisis fisicoquímicos.....	30
5.3.1 Color.....	30
5.3.2 Peso y tamaño.....	32

5.3.3	Firmeza	33
5.4	Actividad Enzimática.....	33
5.4.1	Actividad enzimática de Catalasa (EC. 1.11.1.6)	33
5.4.2	Actividad enzimática de peroxidasa (EC. 1.11.1.7).....	34
5.4.3	Actividad enzimática de superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1).....	34
5.4.4	Actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (EC. 4.3.1.5)	35
5.4.5	Actividad enzimática de lipoxigenasa (EC. 1.13.1.13).....	36
5.4.6	Proteína total	37
5.5	Extracciones hidrofílicas de compuestos fitoquímicos	37
5.5.1	Contenido de fenoles y flavonoides totales.....	38
5.5.2	Actividad antioxidante.....	38
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1	Caracterización de los frutos	40
6.2	Color.....	40
6.2.1	Color Externo.....	40
6.2.2	Color Interno (clorofila total).....	43
6.3	Firmeza y pérdida de peso	44
6.3.1	Firmeza	44
6.3.2	Pérdida de peso	46
6.4	Actividad enzimática	48
6.4.1	Catalasa	48
6.4.2	Peroxidasa	50
6.4.3	Superóxido dismutasa	52
6.4.4	Fenilalanina amonio liasa	53
6.4.5	Lipoxigenasa	56
6.5	Análisis de metabolitos secundarios y actividad antioxidante	57
6.5.1	Contenido de fenoles solubles totales (FST).....	57

6.5.2	Contenido de flavonoides solubles totales (FLST)	60
6.5.3	Actividad antioxidante	63
7.	Conclusiones	67
8.	Bibliografía.....	69
9.	ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Enzimas del ciclo ascorbato-glutación (Hodges, 2003).....	21
Figura 2. Estrategia general seguida para el desarrollo del experimento.	29
Figura 3. Espacio de color CIELab.....	31
Figura 4. Guía visual de clasificación por color externo.	31
Figura 5. Firmeza durante el almacenamiento a 6°C y transferencias a TA.	45
Figura 6. Porcentaje de pérdida de peso durante almacenamiento a 6° y transferencias a TA.....	47
Figura 7. Actividad de Catalasa durante almacenamiento a 6°C.....	49
Figura 8. Actividad de peroxidasa en almacenamiento a 6°C	51
Figura 10. Actividad de SOD durante el almacenamiento a 6°C	53
Figura 12. Actividad de PAL durante las primeras 84 horas de almacenamiento	55
Figura 14. Actividad de LOX en almacenamiento durante almacenamiento a 6°C.....	57
Figura 16. Contenido de fenoles solubles totales durante almacenamiento a 6°C	58
Figura 17. Oscilación en el contenido de fenoles solubles totales durante el almacenamiento.	59
Figura 18. Contenido de flavonoides durante las primeras 40 horas de almacenamiento.61	
Figura 19. Comportamiento de los valores medios de flavonoides solubles totales durante el almacenamiento.....	62
Figura 20. Contenido de fenoles solubles totales durante almacenamiento a 6°C	64
Figura 21. Actividad antioxidante medida con el radical ABTS durante almacenamiento a 6°C	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica del aguacate	17
Tabla 2. Diseño experimental de los tratamientos.....	28
Tabla 3. Resumen de datos de color externo del día 0 comparado con transferencias a temperatura ambiente.....	42
Tabla 4. Análisis de color interno.	43

1. INTRODUCCIÓN

“Aguacate” es la palabra utilizada para referirse al fruto y al árbol que lo produce (RAE- ASALE, 2016). Dicha planta (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia *Laureaceae*,. Los orígenes de esta planta parecen remontarse a alrededor de 65 millones de años en Godwana. Los cambios geográficos posteriores y las migraciones de los habitantes culminaron en su actual distribución y en tres ecotipos reconocidos como los ancestros de las especies que conocemos ahora: antillano (*West Indian*), guatemalteco y el mexicano (Bost et al., 2013; Galindo-Tovar et al., 2007)

Se estima que el fruto ha sido consumido por los humanos hace 16,000 a 18,000 años D.C., y un reporte sugiere que este fue introducido a la cultura maya cerca de 3,400 D.C.; desde entonces el aguacate ha tenido un papel importante en la dieta de las culturas mesoamericanas ya sea como alimento rico en nutrientes o por sus usos medicinales (Galindo-Tovar et al., 2007)

En el 2014, México fue considerado el cuarto productor de aguacate a nivel mundial, y este producto fue el onceavo más importante de la canasta básica, así como el quinto de los alimentos más exportados (“FAOSTAT,” 2015). El año 2016, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera reportó que hubo una superficie sembrada de 7, 153 hectáreas de aguacate orgánico, con una producción de 69, 526 toneladas, es decir, el 3.7% de la producción general de aguacate a nivel nacional (SIAP, 2016). Los principales estados productores de este cultivo son Michoacán, Jalisco, Estado de México y Nayarit, de los cuales el mayor productor es Michoacán, con un volumen estimado de 80.2% del total producido en el país (CONAPA y CONASIPRO, 2016).

De acuerdo con un boletín publicado por la SAGARPA (SAGARPA, 2014) sobre las exportaciones de aguacate, este ya es comercializado en 21 mercados, entre los que se incluyen Japón, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Guatemala, España, China, Países Bajos, Hong Kong, Reino Unido, Singapur y Bélgica; apar-

te de sus mercados principales que son Estados Unidos y Canadá. Para el espacio interanual 2013-2014 el aumento en el volumen de exportaciones fue del 29%.

Dicho crecimiento en la demanda, podría encontrar sus causas enmarcadas en un incremento general en el volumen de evidencias que respaldan los beneficios de su consumo, además de las campañas institucionales para aumentar la cantidad de frutas y hortalizas en la dieta como medio para preservar la salud (WHO, 2014). El fruto del aguacate presenta un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, es bajo en azúcares, y diverso en nutrimentos, que incluyen: vitaminas, minerales y compuestos fitoquímicos antioxidantes, que lo han categorizado recientemente como alimento funcional. Además de esto, posee características agradables de textura, sabor y delicado aroma (Bost et al., 2013; Yahia, 2012).

El manejo durante el mercadeo de este fruto implica retos, debido a su naturaleza climatérica, una vez cosechado, da inicio su maduración comercial, fenómeno que incluye un incremento en su tasa de respiración, de producción de etileno; y en la actividad de diferentes enzimas que modifican su composición, apariencia y textura, volviéndolo más susceptible a desórdenes metabólicos y al ataque de patógenos durante su almacenamiento (Hofman et al., 2013).

Una de las principales causas de pérdidas durante la poscosecha de este fruto se debe al desarrollo de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporoides*), hongo depositado sobre la superficie del aguacate durante su etapa precosecha que desarrolla lesiones oscuras sobre la superficie. Cuando este hongo se encuentra en densidades suficientemente altas puede desarrollarse sobre la superficie del fruto, aun cuando este no presente lesiones. Para su control durante la posrecolección se han usado efectivamente tratamientos a base de cobre o procloraz. Sin embargo, cada vez más países restringen el uso de fungicidas (Dann et al., 2013). Y el uso de cobre se enfrenta a nuevas regulaciones por baja efectividad durante periodos de alta presión por hongos, así como por su ecotoxicidad (Dagostin et al., 2011; Kiaune and Singhasemanon, 2011). Por ello, se vuelve relevante la búsqueda de tecnologías alternativas para el control de este patógeno, así como para la reducción de pérdidas causadas por desórdenes fisiológicos asociados a los cam-

bios que se enfrenta el producto durante su almacenamiento en refrigeración. Por este motivo, el uso combinado de recubrimientos naturales y aceites esenciales, con eficacia probada contra este hongo, podrían ser una alternativa viable para mantener la calidad de los frutos de aguacate –convencional y orgánico-, reduciendo sus pérdidas, sin afectar la percepción del consumidor o tener impacto negativo sobre el medio ambiente por su origen natural.

Para este fin, la presente tesis aportará información acerca de la conducta del fruto de aguacate variedad ‘Hass’ de producción orgánica bajo condiciones de almacenamiento comercial y sobre los cambios a nivel fisiológico y bioquímico que presenta cuando se le aplica un recubrimiento de origen natural combinado con aceites esenciales.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El aguacate orgánico

En años recientes, la demanda de productos de origen natural ha ido en aumento. También el interés de los consumidores se ha extendido hacia los medios de producción, de manera que la historia de los productos se ha vuelto relevante como criterio de elección para los consumidores. De este modo, la producción socialmente responsable, amigable con el ambiente y orgánica se han vuelto no solo esquemas revisitados, sino sellos de valor agregado que satisfacen mercados exigentes en países desarrollados (Lee and Yun, 2015).

Los productores de aguacate en México, conscientes de estos cambios en los mercados, y de la alta rentabilidad de los productos orgánicos en mercados exteriores, se han interesado en sus técnicas de producción como un medio para incrementar sus márgenes de utilidad, y como una vía para probar manejos culturales que puedan mantener los rendimientos altos y reducir el impacto negativo en sus huertos a causa de los métodos convencionales de producción (Reyes A. et al., 1995).

Dicho interés ha generado huertos experimentales, huertos para producción orgánica “por diseño”, o que agricultores migren hacia esquemas de producción orgánica, proceso conocido como *transición*. Junto a dicho interés, los fruticultores e instituciones se han organizado para estandarizar criterios de producción con la finalidad de otorgar confianza al consumidor mediante el uso de certificaciones nacionales como la norma NMX-FF-016-SCFI-2006, y otras normas internacionales basadas principalmente en criterios norteamericanos y europeos, quienes son ahora los continentes que registran mayor consumo de productos orgánicos. Sin embargo, China también se ha vuelto un mercado importante y cuenta con estándares de certificación autónomos (Granatstein et al., 2015).

En el año 2013, se reportó que la superficie cultivada de árboles frutales con manejo orgánico ascendía al 1% del total mundial. Dicho porcentaje, dividido por tipo de cultivo, dio como resultado un promedio entre 0.9 y 2% por tipo de cultivo (*i.e.* manzana, durazno, etc.); y la producción de aguacate fue la más alta con un 8.7% de participación en los cultivos orgánicos de árbol. En dicha categoría, México resultó ser el productor más alto con un aporte del 92% de la producción mundial de aguacate orgánico (Granatstein et al., 2015), cifra que vuelve de interés capital para las investigaciones relativas al manejo poscosecha en este cultivo.

Desafortunadamente, información detallada sobre la producción orgánica a nivel nacional es escasa aunque hay interés en la colección de datos de este nicho de mercado.

2.2 Taxonomía

De acuerdo a la base de datos del NCBI y el Sistema de Información Taxonómica Integrada (*ITIS*, por sus siglas en inglés), la descripción que se muestra en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Descripción taxonómica del aguacate¹

Categoría	Nombre
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>
Infrareino	<i>Streptophyta</i>
Superdivisión	<i>Embriophyta</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Spermatophytina</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden	<i>Magnoliana</i>
Orden	<i>Laurales</i>
Familia	<i>Lauraceae</i>
Género	<i>Persea Mill</i>
Especie	<i>Persea americana Mill.</i>
Variedad	<i>drymifolia</i>

2.3 Importancia comercial del aguacate orgánico

El 7 de febrero de 2006 fue publicado en el Diario Oficial de la Federación la Ley de Productos Orgánicos (“Ley de Productos Orgánicos,” 2006), en la que ya se establecen regulaciones tanto de los sistemas de producción orgánicos, esquemas de certificación y los criterios a seguir para la importación de los mismos, emulando un conjunto de regulaciones aceptadas internacionalmente, con miras a una búsqueda posterior de equiparación con certificaciones de otros países para facilitar el comercio internacional.

En el 2015, la Asociación de Comercialización de Productos Orgánicos OTA, por sus siglas en inglés), publicó un análisis de mercado y encontró que en el 2014, el 97% del aguacate orgánico importado en los Estados Unidos fue de origen mexicano, lo que significó un valor económico cercano a los 36 millones de dólares; es decir, casi el doble de los 18.8 millones que fueron reportados en el año 2013. Aunque esta duplicación en el crecimiento no ha sido una tendencia

¹ (Integrated Taxonomic Information System, 2016)

regular, en el periodo 2011-2014 el crecimiento anual estimado del 37.7% también representa una cifra importante (Jaenicke and Demko, 2015).

De acuerdo a un reporte publicado por la USDA, para el periodo 2015-2016 se proyectaba un incremento de 750,000 toneladas métricas de importación de aguacate a EE.UU (“Mexico: Avocado Annual | USDA Foreign Agricultural Service,” 2015). Otro reporte (Jaenicke and Demko, 2015), mencionó que la producción de aguacate orgánico en México cubre el 92% de la demanda mundial; y un boletín de la SAGARPA (SAGARPA, 2014), mencionó que el crecimiento en número de mercados y la rentabilidad de este producto ha tenido un aumento sostenido que parece seguir a la alza, lo que pone en relieve la importancia del estudio de este cultivo que gana, progresivamente, importancia económica en el país.

2.4 Problemas frecuentes durante el manejo poscosecha del aguacate orgánico

Un reporte reciente de Granatstein et al., (2015), publicó una tabla comparativa de los problemas más comunes durante el mercadeo que se presentan entre los productos orgánicos de árbol más comercializados y sus pares producidos convencionalmente. Sin embargo, para el aguacate no se reportó información, ni se dispone de algún otro reporte que muestre ocurrencia de problemas nuevos o diferentes durante el periodo poscosecha en contraste con el producido convencionalmente.

Sobre el aguacate de producción convencional hay abundante información acerca de problemas en esta etapa, la mayoría ocurren durante los últimos estadios de madurez en el fruto. Los problemas más comunes del aguacate son: la aparición de desórdenes fisiológicos, como el oscurecimiento de haces vasculares; y la pudrición peduncular, este último causado por infecciones fúngicas de diferentes hongos entre los que destaca la especie *Colletotrichum*, la cual se internaliza a través del pedúnculo (Hofman et al., 2013). Estos problemas son regular-

mente tratados con aplicaciones pre-cosecha procloraz o cobre en cultivos convencionales (Yahia, 2012); o de *caldo bordelés* (mezcla acuosa de cobre-calcio) o extracto de ajo en producción orgánica (comunicación personal). Sin embargo, el procloraz no está permitido para su uso en productos orgánicos y el cobre está limitado a determinadas presentaciones (OMRI, 2017; USDA, 2011).

Una alternativa que ha mostrado buenos resultados en el tratamiento de este problema ha sido el uso de aceites esenciales (AE) (Sivakumar and Bautista-Baños, 2014). Estos han mostrado aceptación por el público debido a su origen natural y gracias a que son una alternativa sostenible para reducir la generación de resistencias en los microorganismos que son tratados con ellos.

Se ha reportado que los AE ricos en R-(-)-carvona pueden ser buenas alternativas a fungicidas sintéticos para el manejo poscosecha de aguacate (Regnier et al., 2010; Sellamuthu et al., 2013b). La actividad antifúngica de los AE está documentada y ha demostrado inhibir el crecimiento del hongo *C. gloeosporioides in vitro* e *in vivo* en aguacate. Por lo anterior, los AE y sus componentes están ganando cada vez mayor interés debido a su volatilidad, estado relativamente seguro, y la amplia aceptación por los consumidores, debido a sus propiedades ecológicas y biodegradables. Regnier et al., (2010) recomienda una combinación de aceites esenciales (*Lippia scaberrima* Sond, rica en R-carvona, (D)-limoneno y 1,8-cineol) con un recubrimiento comercial (Avoshine®) como un tratamiento poscosecha aceptable para el mercado orgánico, y para el control de la antracnosis en aguacates, al reducir la pérdida de agua y controlar los daños causados por este hongo con resultados similares a un tratamiento de procloraz, pero sin los efectos negativos o restricciones de uso de este último.

Recientemente el uso de vapores de tomillo mostró una completa reducción de la antracnosis *in vitro*, así como la incidencia y severidad de esta enfermedad en frutos de aguacate, y un aumento en el contenido de compuestos fenólicos y de la actividad del sistema antioxidante. Estos resultados, mostraron mayor efectividad, inclusive, que el procloraz (Sellamuthu et al., 2013b). Sin embargo, estas fumigaciones poscosecha no se han probado en escala comercial y su método de

aplicación podría implicar una distribución no uniforme en el producto dentro de las cámaras de fumigación, por lo que podrían ser probadas alternativas que aseguren la uniformidad de la aplicación.

2.5 Actividad del sistema enzimático antioxidante

La refrigeración es un método de conservación en frutas y hortalizas como un método para reducir la velocidad de sus procesos metabólicos, alargando su vida útil. Sin embargo, la disminución de temperatura también es un agente de estrés oxidativo que promueve la senescencia de células y tejidos cuando los sistemas primarios de defensa son rebasados por la formación de prooxidantes. Para lidiar con este tipo de estrés, una respuesta de las plantas es la producción de compuestos fenólicos y flavonoides, que evitan la oxidación del ascorbato, ácidos grasos y β -caroteno o fungen como sustrato para POD. (Hodges, 2003). Por otro lado, la actividad de las enzimas del ciclo glutatión-ascorbato (Figura 1) también se ven activadas bajo diferentes condiciones de estrés, como consecuencia de una pérdida del balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células y la pérdida de homeostasis. Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es una de las primeras especies en ser generadas después de la reducción molecular del oxígeno y tiene una fuerte capacidad oxidante. El peróxido de hidrógeno puede ser originado de la dismutación del radical superóxido y puede afectar la actividad de otras proteínas con grupos tiol. Para mantener el balance, es fundamental la actividad de peroxidasa (POD) y catalasa (CAT) para reducir su ingreso a las reacciones de Fenton o Haber-Weiss mediante las cuales se produce el radical hidroxil, el cual se considera el oxidante más reactivo, el cual puede iniciar la peroxidación de lípidos o daños a proteínas y moléculas de ADN (Szollosi, 2014).

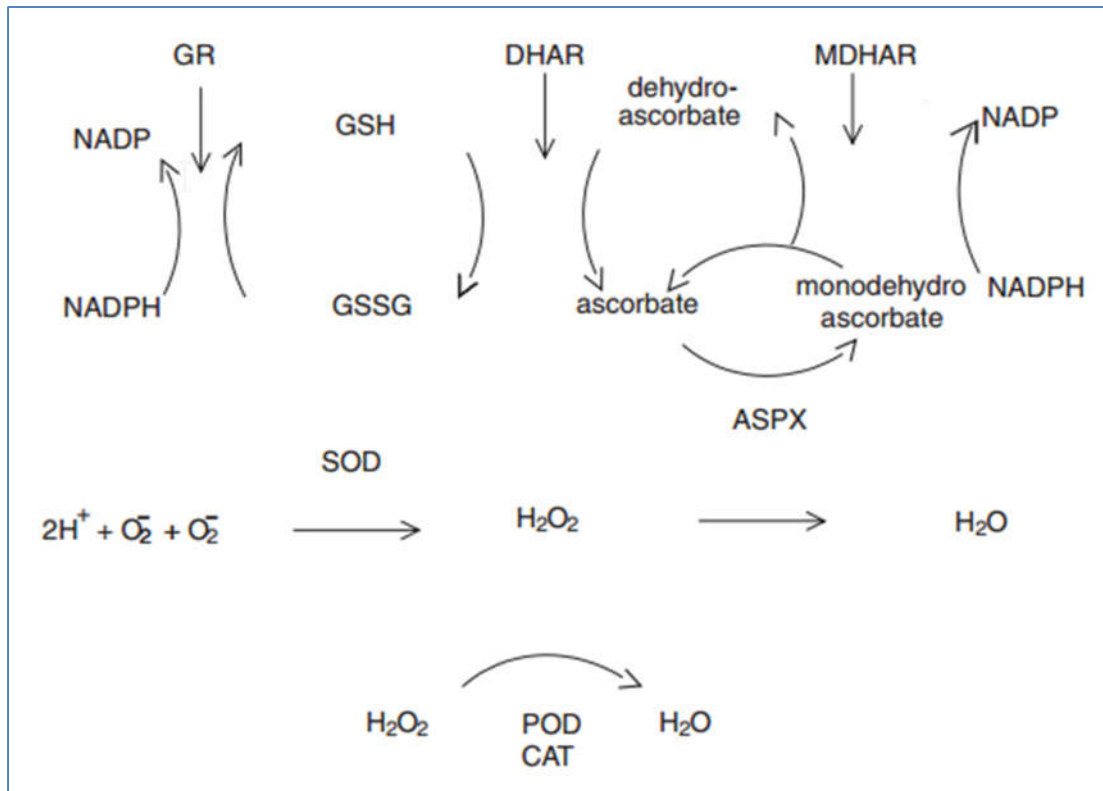


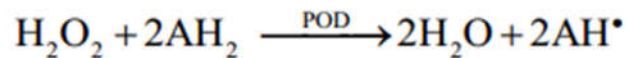
Figura 1. Enzimas del ciclo ascorbato-glutati3n (Hodges, 2003)

Catalasa es la enzima m1s activa en sistemas aer3bicos localizada tanto en peroxisomas, mitocondrias y citoplasma, sitios donde generalmente son producidas la mayor cantidad de especies reactivas de ox3geno por diferentes procesos metab3licos. Esta enzima responsable de una importante actividad antioxidante degradando H_2O_2 producido en la cadena transportadora de electrones, en la fotorrespiraci3n y en la oxidaci3n de 1cidos grasos cuando la planta se encuentra en condiciones de estr3s (Sharma and Ahmad, 2014).

La presencia de H_2O_2 en la planta puede reaccionar con grupos $-\text{SH}$ inactivando enzimas importantes en el metabolismo, como la sedoheptulosa en aguacate, as3 como reaccionar con metaloprote3nas, afectando su actividad biol3gica. Sin embargo, el H_2O_2 es tambi3n importante como se1alizador en transducci3n de se1ales, as3 como en procesos de lignificaci3n, crecimiento celular y de tejidos (Cheeseman, 2007).

Durante el enfriamiento de productos hortícolas, se genera una depleción de Pi que genera la reducción en número de aceptores de electrones en glicerato-1,3-bifosfato, lo que crea un desbalance en la fotostasis, y una consecutiva dificultad para fijar CO₂. Esta condición favorece la acumulación de ERO, entre las que se incluye en H₂O₂. Durante la refrigeración, asimismo, produce una caída en la tasa de actividad enzimática, lo que puede agravar los efectos adversos de la acumulación de ERO (Shabala, 2012). Por lo que una previa estimulación de esta enzima, podría reducir la cantidad de ERO originados durante las primeras horas de refrigeración, alargando la vida útil de los frutos.

La enzima peroxidasa realiza la oxidación de un electrón en diferentes compuestos en presencia de H₂O₂, reduciendo este compuesto a agua mientras oxida diversos sustratos mediante la siguiente reacción resumida (Nokthai et al., 2010):



La actividad de esta enzima, junto con CAT, tiene un papel fundamental en la regulación de los niveles de H₂O₂, los cuales pueden servir como señales para la regulación de genes de la enzima celulasa, así como la degradación de cadenas de polisacáridos de la pared celular (Yang et al., 2015), lo que puede afectar la firmeza del fruto, reduciéndola, durante su almacenamiento y acortando su vida útil.

Superóxido dismutasa es la enzima responsable de la dismutación del anión superóxido, esta enzima inhibe la producción de etileno limitando la formación del radical hidroxilo, protegiendo además las células contra toxicidad por oxígeno (Baker, 1976). El oxígeno además de ser una molécula fundamental para los sistemas aerobios, también puede tener efectos conocidos en el manejo postcosecha como la oxidación de ácidos grasos, generando rancidez, despolimerización de polisacáridos, además de otros efectos nocivos como la pérdida de color y sabor. La acumulación de electrones en la molécula de oxígeno, puede producir su radical superóxido (O₂⁻), o su correspondiente ácido, el radical peroxihidril. (·OOH) (Donnelly

et al., 1989). Esta enzima, al producir radicales hidroxilo puede ser un factor de toxicidad en las células y por ello, mantiene una estrecha relación con enzimas degradantes de dicho radical: catalasa y peroxidasa.

Fenilalanina amonio liasa es cataliza la desaminación no-oxidativa del aminoácido fenilalanina a ácido *trans*-cinámico con la formación de un ion de amonio. Los síntesis de fenoles y compuestos otros compuestos fenólicos está regulada por esta enzima, que es el paso para esta conversión a través de la ruta de los fenilpropanoides (Hyun et al., 2011; Lafuente et al., 2004). Esta ruta es fundamental en el metabolismo secundario. Sus productos son propanoides, compuestos fenólicos y flavonoides que tienen funciones de estructurales, de defensa y antioxidantes (Engelbrecht and Berg, 2013).

Lipoxigenasa tiene como función la oxigenación de ácidos poliinsaturados para formar hidroperóxidos que pueden ser substratos, como metil jasmonato o inhibidores de proteinasas, los cuales juegan un rol fundamental en el sistema de defensa de las plantas. Aunque no se conoce con precisión el mecanismo de resistencia, se ha demostrado que la inhibición de esta enzima en cultivos genéticamente modificados los vuelve susceptibles a la invasión exitosa por fitopatógenos (Baysal and Demirdöven, 2007).

2.6 Recubrimientos

El recubrimiento consiste en la aplicación de una capa fina y uniforme de un producto capaz de regular el intercambio de gases y vapor de agua con el exterior para mantener la calidad por periodos prolongados (Olivas and Barbosa-Cánovas, 2009). Su objetivo central es retardar la transferencia de gases, vapor y compuestos volátiles, creando una atmósfera modificada que reduce la tasa respiratoria, la pérdida de humedad por transpiración, y por tanto, la senescencia, pérdida de aroma y, en algunos casos, los cambios de color relativos a este proceso; además de conferir brillo, que puede ser un valor agregado en algunos casos. Asimismo los recubrimientos se han estudiado como acarreadores de sustancias que ayudan a multiplicar los efectos positivos, como produc-

tos antimicrobianos o sustancias antioxidantes (Bosquez-Molina et al., 2003; Dhall, 2013; H. j. Park et al., 1994; H. J. Park et al., 1994; Valencia-Chamorro et al., 2011).

Estos recubrimientos han sido ampliamente usados en diferentes productos hortícolas entre los que se incluyen los cítricos, manzana, mango, aguacate, tomate, fruta de la pasión, pepinos, pimientos, pera; inclusive piña y lichi (Dhall, 2013).

El procedimiento de aplicación consiste en el uso de equipos especializados por medio de emulsiones acuosas o espumas, lo que es seguido por un cepillado para asegurar su correcta distribución y generación de brillo (Yahia et al., 2011).

Para el fruto del aguacate, se han probado diferentes recubrimientos con resultados favorables, entre los que se incluyen el mantenimiento de la firmeza y el contenido de sólidos, así como la actividad de agua, luminosidad, una reducción en la pérdida de agua e incidencia de fitopatógenos que frecuentemente ocasionan pérdidas durante la distribución (Maftoonazad et al., 2007; Maftoonazad and Ramaswamy, 2005). Sin embargo, no se cuenta con reportes sobre el comportamiento del aguacate orgánico con o sin recubrimientos durante su almacenamiento.

El uso de recubrimientos a base de quitosano ha mostrado la inducción de la enzima quitinasa presente en los frutos, efecto que se ha atribuido a su contenido natural de quitosán, el cual ha sido utilizado como base para otros recubrimientos comerciales (Dhall, 2013).

Aunque otros recubrimientos no han mostrado tener el mismo efecto inductor gracias a su composición normal sin aditivos, sí se ha reportado que su combinación con aceites esenciales o agentes inductores aislados (i.e. proteínas) logran incrementar la vida de anaquel del fruto mediante un efecto combinado de inhibición directa del crecimiento de fitopatógenos; también de un aumento en la actividad en las algunas enzimas del sistema antioxidante y de defensa contra patologías (Bill et al., 2014; Saucedo-Pompa et al., 2009; Sellamuthu et al., 2013b).

Un reciente meta análisis documentó que los frutos orgánicos se comportan de manera diferente durante el almacenamiento, mostrando mayor vida de anaquel en parámetro fisicoquímicos y composicionales asociados al mantenimiento de la calidad (Mdits-hwa et al., 2017). Sin embargo, este estudio ni otros han presentado información sobre el aguacate orgánico, con o sin recubrimientos, que sirva para orientar a los productores

sobre las posibilidades de comercialización basadas en la vida útil o comportamiento del fruto bajo condiciones comerciales ya usadas para manejo del fruto de producción convencional.

Conforme la percepción del consumidor en la adquisición de productos hortícolas se vuelve preponderante en países con altos volúmenes de importaciones, los productores de aguacate orgánico han incrementado el número de hectáreas dedicadas a este fruto. Sin embargo, bajo este esquema de producción, las alternativas para reducir las pérdidas poscosecha se ven reducidas debido a las restricciones impuestas por regulaciones propias de cada país de destino y organismos internacionales certificadores. Durante el almacenamiento refrigerado en el mercadeo, los frutos se vuelven más susceptibles a los desórdenes metabólicos que causan disminución en su calidad, así como vulnerabilidad frente al ataque de patógenos. El uso de recubrimientos de origen natural y la fumigación con vapores de aceites esenciales de tomillo y orégano en aguacate han mostrado, por separado, mantener la calidad del fruto por mayor tiempo de almacenamiento, así como la inhibición del patógeno reportado como el mayor causante de pérdidas poscosecha, respectivamente. La combinación de ambas tecnologías ha sido probada en frutos de producción convencional y ha mostrado ser eficaz al reducir la incidencia y severidad del ataque de la antracnosis, mientras que prolonga la vida útil al reducir la pérdida de agua y los desórdenes asociados a ésta. Sin embargo, no se cuenta con información sobre el aguacate orgánico durante el almacenamiento y el efecto que el uso de una combinación de aceites esenciales y un recubrimiento natural tienen sobre su fisiología.

3. JUSTIFICACIÓN

México es uno de los países con mayor producción de aguacate 'Hass' en el mercado hortícola internacional de producción convencional, y el primero de tipo orgánico. Los productores, dentro de la demanda creciente de productos de esta categoría, buscan ampliar su oferta hacia mercados más rentables como compensación por las fuertes inversiones y esfuerzos implícitos en este esquema de agricultura, como lo son los mercados distantes.

Sin embargo, los estándares de producción orgánica reducen el número de las tecnologías permitidas para su manejo pre y poscosecha a únicamente aquellos seguros, de baja o cero residualidad, que estén permitidos por la OMRI u otros registros de acuerdo al país de exportación, entre los que se incluyen aquellos productos de origen natural.

Los desórdenes metabólicos y microbiológicos que se presentan en la comercialización de aguacate orgánico son todavía causa de pérdidas económicas y un obstáculo para su posicionamiento exitoso entre los abastecedores importantes de los mercados distantes más rentables.

Estos problemas presentan una oportunidad para comprender mejor aspectos del manejo poscosecha del aguacate orgánico, del cual se carece de información, así como una ventaja para el desarrollo o mejoramiento de tecnologías y estrategias que reduzcan la pérdida de alimentos y de las fuertes inversiones hechas en su producción y mercadeo.

El propósito de este trabajo es generar información sobre los cambios bioquímicos y fisiológicos que se inducen por la aplicación de recubrimientos comerciales de origen natural combinados con aceites esenciales en frutos de aguacate orgánico, para analizar los potenciales beneficios sobre los parámetros de calidad y vida de anaquel, así como sus posibilidades de uso como tecnología para disminuir las pérdidas poscosecha.

Esta información también podría orientar nuevos trabajos en el manejo poscosecha de aguacate convencional ya que ambas tecnologías, AE y recubrimientos orgánicos, sólo han sido probadas separadamente en este tipo de frutos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar los cambios fisiológicos y bioquímicos inducidos por la aplicación del recubrimiento Natural Shine 505-OR® de origen natural en combinación con aceites esenciales con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas, y su efecto en la calidad y en el sistema antioxidante en frutos de aguacate de producción orgánica durante su vida poscosecha.

4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar los efectos de la aplicación del recubrimiento de origen natural con y sin aceites esenciales en los parámetros de calidad (textura, color, peso) durante el almacenamiento poscosecha del fruto en condiciones comerciales simuladas (6°C, 95% HR).
- b) Estudiar el efecto de la aplicación de los recubrimientos en el perfil de metabolitos secundarios y su relación con la capacidad antioxidante.
- c) Evaluar la actividad de enzimas del sistema antioxidante y de defensa (SOD, POD, CAT y LOX) y de la síntesis de compuestos fenólicos (PAL) por efecto de los tratamientos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño Experimental

En la Figura 2 se muestra la estrategia general seguida para el desarrollo del experimento.

Se utilizó un diseño factorial 3x2 con mediciones a lo largo del tiempo. Los factores de estudio fueron los aceites esenciales a evaluar (timol y orégano) en tres niveles (sin AE; y 2 niveles de AE), con dos réplicas y tres repeticiones por tratamiento (Tabla 2). Cada unidad experimental constó de 2 frutos, cuyo mesocarpio fue combinado para su análisis. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo en cada uno de los nueve muestreos efectuados.

Tabla 2. Diseño experimental de los tratamientos

Factor	Niveles	Réplicas	Número de muestreos	Repeticiones	UE*
Aceite esencial de orégano	Sin AE	2	9	2	2
Aceite esencial de tomillo	3ml / litro	2	9	2	2
	5ml / litro	2	9	2	2

*UE = Unidad experimental de 2 frutos

Para el análisis estadístico se utilizó el *software* estadístico JMP versión 8.0. Los datos fueron tratados mediante un análisis de varianza en el que se comparó el efecto del tratamiento en cada periodo del muestreo. Cuando el análisis resultó significativo, se procedió a un análisis de comparación de medias mediante la prueba de Tukey en el análisis de parámetros físico-químicos, o la prueba de Dunnett en la actividad de las enzimas y la actividad antioxidante con un $\alpha=0.05$, usando como control negativo los frutos sin recubrimiento. La prueba de Dunnett fue elegida para evaluar estos parámetros, pues se consideró relevante únicamente el efecto elicitor que pudiera mostrar cambios bioquímicos y fisiológicos contra un fruto sin recubrimiento.

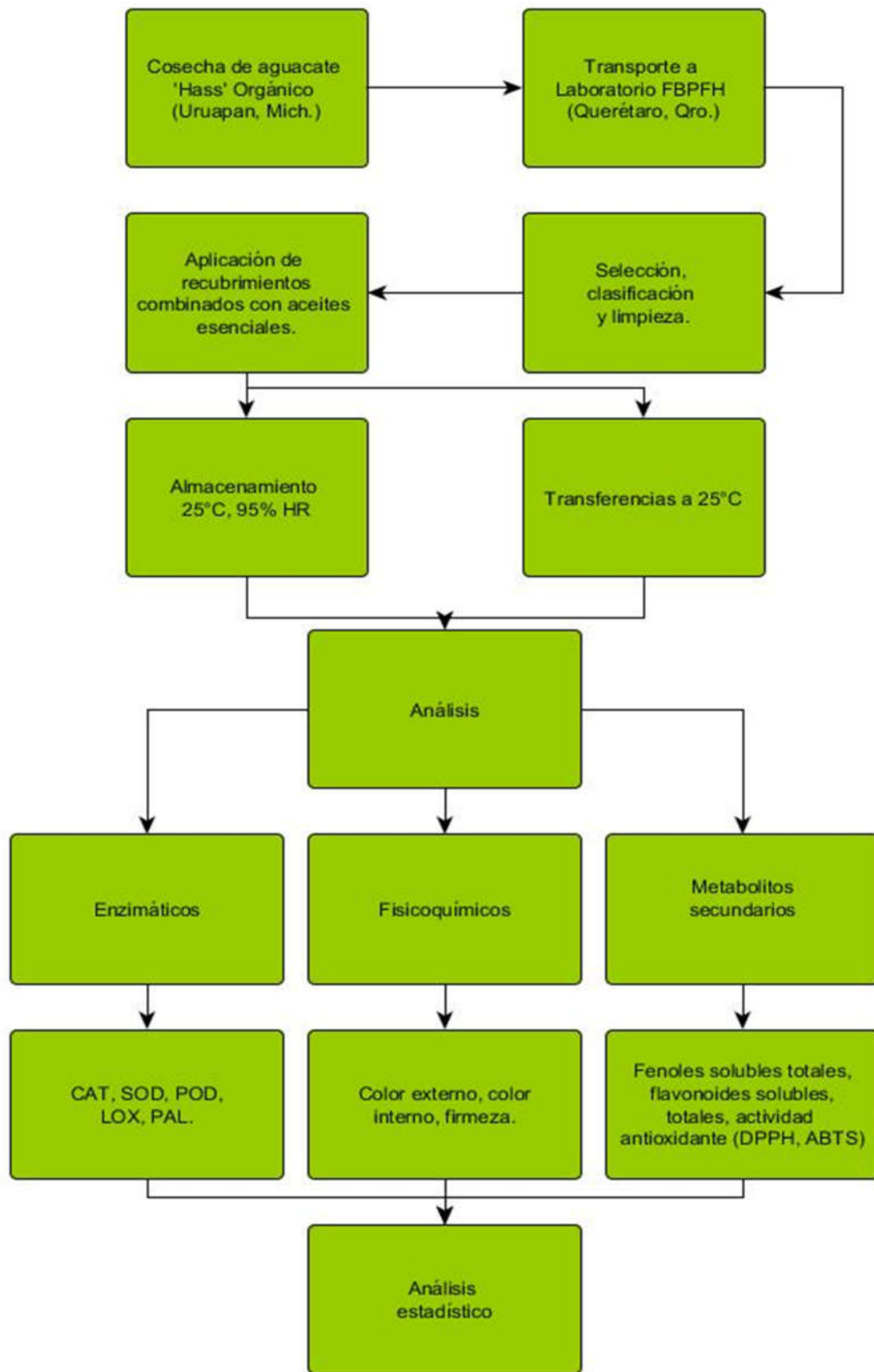


Figura 2. Estrategia general seguida para el desarrollo del experimento.

5.2 Aplicación de recubrimientos

La muestra de los frutos designados para tratamiento los fueron tratados con el producto Natural Shine 505-OR® (Valent Biosciences Co., USA), para productos orgánicos con NaOH (<5%) a base de carnauba. Estos recubrimientos fueron mezclados añadiendo los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens Kunth*) o tomillo (*Thymus vulgaris L.*) en dos concentraciones de 3 o 5 ml·L⁻¹ por separado y mezclados durante 5 minutos a 300rpm con un agitador magnético a 25°C. Fueron aplicados con esponjas suaves hasta conseguir una cobertura uniforme y libre de burbujas sobre frutos previamente seleccionados. La selección de frutos fue manual. Los frutos seleccionados se limpiaron cuidadosamente con un paño humedecido con agua destilada. Después de la aplicación de los tratamientos, se dejaron secar durante 30 minutos a 25°C sobre mesas de trabajo y, posteriormente, fueron almacenados a 6°C y 95 %HR. Como controles se utilizaron frutos con recubrimiento sin aceites esenciales (control positivo), y sin recubrimiento (control negativo).

5.3 Análisis fisicoquímicos

5.3.1 Color

La medición objetiva del color se realiza mediante la comparación parámetros específicos contra un espacio de color establecido por convención (Figura 3). Estos parámetros son medidos por un equipo de espectrofotometría capaz de traducir los datos percibidos a valores numéricos que funcionan como constantes en la ecuación de un punto ubicado en el espacio de color tridimensional. Los parámetros medidos son tono, luminosidad y saturación. En el espacio Cielab encontramos los valores de luminosidad (L*) y cromaticidad (a* y b*).

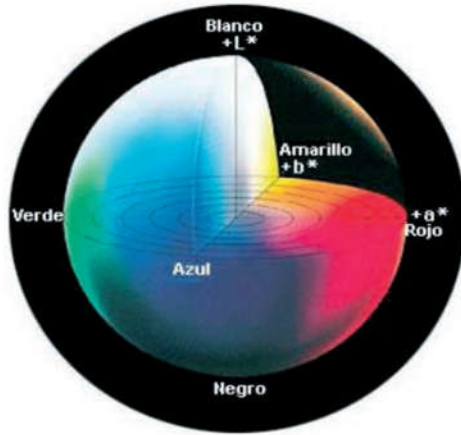


Figura 3. Espacio de color CIELab

Durante la recepción del fruto se determinó el estado de madurez No.1, de acuerdo a la tabla de clasificación de *Avocados Australia Ltd.* (Figura 4)

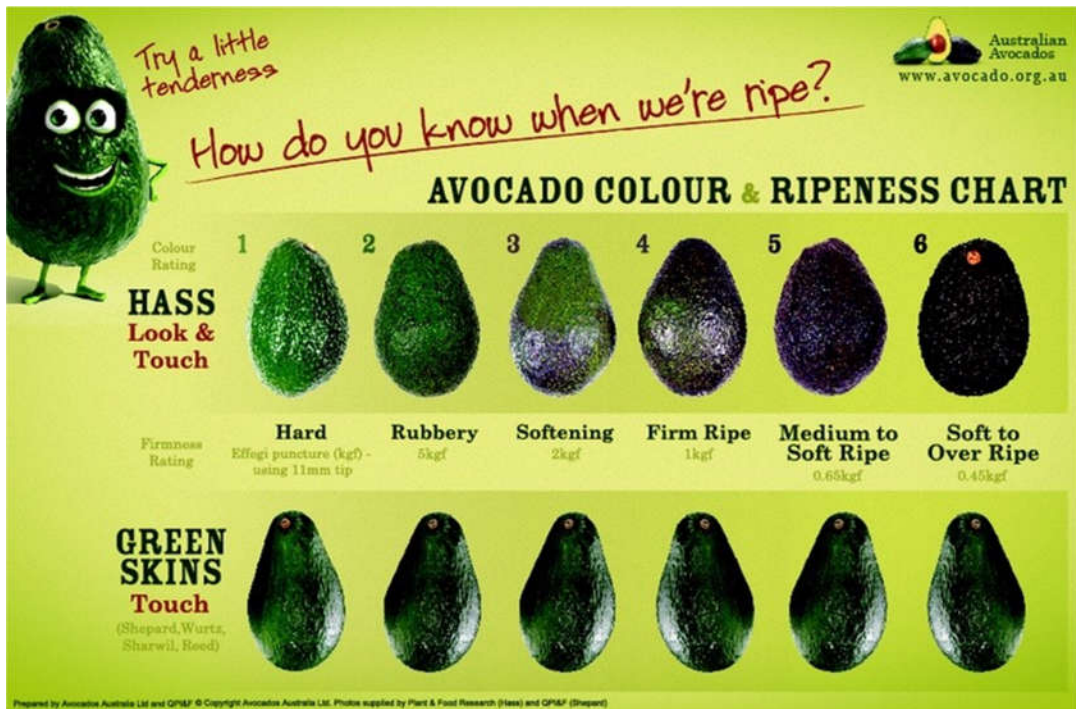


Figura 4. Guía visual de clasificación por color externo.

El color externo durante los nuestros consecutivos fue medido eligiendo tres puntos representativos del fruto, sobre los que se hicieron mediciones con un espectrofotómetro CM2002 utilizando la escala cielab (Minolta, Osaka-light source D65) y fueron promediadas. Los datos se expresaron en unidades $L \times a \times b$.

El color interno fue determinado por el contenido total de clorofilas, según lo reportado por Woolf and Laing, (1996) con ligeras modificaciones. Tomando 10 muestras en forma de cubos (0.8 cm por lado, aproximadamente) en la zona ecuatorial del fruto. Estas muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C hasta su análisis. Los discos se mezclaron y molieron en nitrógeno líquido; luego se tomó 1g de polvo y se mezcló en 10ml de acetona al 85% que contenía CaCO_3 al 1% (p/v), y fue homogeneizado por 30 segundos. El extracto fue centrifugado a $3000 \times g$ y la densidad óptica del sobrenadante fue medida a 652nm. La clorofila se midió usando la fórmula estándar reportada por Arnon, (1949):

$$C = \frac{D_{652} \times 1000}{34.5}$$

En donde C es igual al contenido de clorofila; D_{652} es la longitud de onda a la que fue medida la densidad óptica; y 34.5 el coeficiente de absorción específico e esta longitud de onda.

5.3.2 **Peso y tamaño**

El peso (g) y el tamaño (cm) fueron registrados utilizando una báscula y un calibrador (o *pie de rey*), respectivamente. Las dimensiones se consideraron para la caracterización inicial; el peso fue medido a lo largo del tiempo para registrar cambios que se pudieran asociar a los tratamientos.

5.3.3 Firmeza

La firmeza de los frutos fue medida de acuerdo al método reportado por Jeong et al., (2003) con ligeras modificaciones. Se tomó un fruto entero y se removió un área de 1cm^2 exocarpo, aproximadamente, en la zona ecuatorial; luego, usando un texturómetro Brookfield CT325 con una sonda plana de 7mm de diámetro y una celda de 25kg, se estableció la fuerza de contacto cero entre la sonda y el mesocarpio del fruto. Posteriormente, la prueba se realizó a 2mm de deformación en dos puntos equidistantes, separados por un ángulo de 90° en la misma zona ecuatorial a una velocidad de $10\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ y la firmeza fue registrada como fuerza en Newtons (N).

Para la medición de la firmeza, se probó en primer lugar una punción directamente en el lado opuesto (girando el fruto 180°) y se encontró que no había reproducibilidad de las mediciones debido a la presión ejercida sobre la zona opuesta, es decir, donde se haría la segunda medición, que resultó siempre en valores menores a la primer punción (datos no mostrados). Para solucionar este problema, se optó por girar el fruto sólo 90° , para la segunda medición. Con este cambio, se obtuvo mayor consistencia en las repeticiones.

5.4 Actividad Enzimática

5.4.1 Actividad enzimática de Catalasa (EC. 1.11.1.6)

Se determinó de acuerdo al método descrito por Rivera-Pastrana et al.,(2013), con ligeras modificaciones. La enzima se extrajo de 0.2g de polvo de acetona (PA) obtenido del tejido fresco de mesocarpio; se homogeneizó en 10ml de Tris-HCl 0.1M (pH 8.5) a 4°C . Luego, la mezcla fue agitada durante 20 minutos a 4°C y se centrifugó durante 20 minutos a $20,984 \times g$ a 4°C . El sobrenadante se consideró como extracto crudo donde estaba la enzima. La mezcla de reacción contuvo 3ml de Tris-HCl 10mM (pH 8.5) y $100\mu\text{l}$ de H_2O_2 al 0.88%. La reacción se inició mediante la adición de $200\mu\text{l}$ de extracto de enzima. La actividad de CAT se monitoreó a 240nm durante 5 minutos a temperatura ambiente ($25\text{-}27^\circ\text{C}$) en un

espectrofotómetro UV-Vis de doble haz de luz (Lamba 40, Perkin Elmer). Como blanco se utilizó la misma mezcla de reacción sustituyendo el extracto enzimático por el mismo volumen de solución tampón de extracción. Una unidad de actividad específica de CAT se describe como la descomposición de $1\mu\text{mol}$ de $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

5.4.2 Actividad enzimática de peroxidasa (EC. 1.11.1.7)

La enzima se extrajo de 0.2g de PA de tejido fresco, se homogeneizó en 10ml solución tampón de fosfatos 0.1M (pH 7) a 4°C. La mezcla fue agitada durante 20 minutos a 4°C, luego centrifugada durante 20 minutos a 20,984 x g a 4°C; y el sobrenadante fue decantado a través de tela de organza. Este decantado fue considerado como el extracto de enzima. Se pre-incubaron por 5 minutos 1030 μl de mezcla de reacción (fosfato de sodio 100mM, pH7; y que contenía 20mM de guayacol) y 270 μl de extracto enzimático a 30°C. La actividad de POD fue medida a 470nm durante 5 minutos a 30°C en incubación. La reacción inició con la adición de 500 μl de una solución de H_2O_2 100mM y se midió el incremento en la absorbancia por 120s. La actividad específica de POD se reportó como $\Delta A_{460\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹ Esta actividad se determinó conforme al método reportado por Sellamuthu et al., (2013) con modificaciones para ajustarlo a un volumen de 3ml.

5.4.3 Actividad enzimática de superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1)

La enzima se extrajo de 0.2g de polvo de acetona de tejido, se homogeneizó 30 segundos a 15,000 rpm en 10ml de tampón de fosfato de sodio 50mM (pH 7.8) a 4°C, utilizando homogeneizador Ultra Turrax T25D (IKA Works, Wilmington, NC); luego, se centrifugó durante 30 minutos a 20,984 x g y 4°C; y el sobrenadante fue decantado. La mezcla de reacción consistió en 27ml de *buffer*

de fosfato 0.05M (pH 7.8) que contenía EDTA 0.1mM, 1.5ml de solución de L-metionina 0.2M y 1ml de nitroazul de tetrazoilo 1.7mM y 0.75ml de TritonX-100 al 1%. Se tomaron 0.3ml de la solución de riboflavina 117 μ M y 0.4ml de extracto de la enzima, al que se le añadieron 3ml de mezcla de reacción y se agitaron. Entonces, la mezcla de reacción fue expuesta a la luz fluorescente emitida por una lámpara de 20W por 15min, y la absorbancia fue medida a 560nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 40, Perkin Elmer). La velocidad de reacción se determinó como el incremento de la absorbancia debido a la formación de formazán de nitroazul de tetrazoilo por unidad de tiempo. Una unidad de SOD se definió como la concentración de extracto de enzima que inhibió el 50% de la formación de formazán de nitroazul de tetrazoilo. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (24-26°C). La actividad específica de SOD fue expresada como unidades de actividad por gramo de proteína (U \cdot min⁻¹ \cdot gprot⁻¹). Se determinó de acuerdo a lo reportado por Rivera-Pastrana et al. (2013) con ligeras modificaciones.

5.4.4 Actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (EC. 4.3.1.5)

Los extractos se realizaron de acuerdo al método propuesto por Sellamuthu *et al.*, (2013) con ligeras modificaciones. Se homogeneizaron 0.2g de PA de tejido de mesocarpio en 10ml de solución tampón de boratos 0.1M, pH 8.8, añadiendo 5mM de β -mercaptoetanol, 2mM de EDTA y 1% de Polivinil-polipirrolidona (PVPP) durante 30 segundos a 15,000 rpm usando un homogeneizador Ultra Turrax (IKA Works, Wilmington, NC). Luego esta mezcla fue centrifugada por 30 minutos a 20,984 $\times g$ a 4°C. El sobrenadante fue filtrado por membranas de 0.45 μ m y considerado como extracto de la enzima.

La reacción fue llevada a cabo de acuerdo a lo reportado por (Da Cunha, 1987) para inhibir la actividad de fenilalanin-amonio transaminasa (PAT) y la formación de fenilpiruvato: 440 μ l de extracto enzimático y 1300 μ l de una solución inhibidora de PAT (10mM L-aspartato, 20mM de ácido α -cetoglutárico y 20mm de

piridoxal-5'-fosfato) fueron incubados por 30 minutos a temperatura ambiente, TA, (24-26°C). Luego se añadieron 1300µl de L-fenilalanina (para conseguir una concentración final de 10mM en la reacción). La reacción fue incubada por 2 horas a TA (24-26°C), la cual se detuvo con la adición de 100µl de HCl 6M y se midió su absorbancia a 290nm. La actividad de PAL se expresó como nanomoles de ácido cinámico·h⁻¹·g⁻¹ de polvo de tejido extraído con acetona.

5.4.5 Actividad enzimática de lipoxigenasa (EC. 1.13.1.13)

El método reportado por Romero y Barrett, (1997) fue utilizado para esta determinación, con ligeras modificaciones: muestras de 0.1g de PA de mesocarpio de aguacate fueron homogeneizadas en 10ml de solución tampón Tris-HCl 0.1M (pH 8, 4°C) por 1 minuto usando un homogeneizador Ultra Turrax (IKA Works, Wilmington, NC) a 15,000 rpm. El extracto fue centrifugado por 20 minutos a 20,984 x g a 4°C. El sobrenadante fue transferido a tubos eppendorf, y refrigerado a 4°C, y analizado de inmediato.

El sustrato fue preparado siguiendo la metodología reportada por Grossman y Zakut, (1979) para reducir enturbiamiento; haciendo una solución madre de 157.2 µl de ácido linolénico al 1% en etanol absoluto, a la que se añadieron 157.2µl de Tween 20. Los ingredientes se mezclaron con ayuda de una pipeta Pasteur para evitar la formación de burbujas. Esta solución se llevó a sequedad, usando rotaevaporador (Büchi Labortechnik AG). La mezcla fue resuspendida en 10ml de Na₂HPO₄ (0.05M) y clarificada añadiendo NaOH 1M hasta conseguir pH 9. Antes del análisis esta mezcla fue aforada a 200ml con tampón citrato-fosfato 0.2M (pH 7.2) para conseguir una concentración final de 2.5mM de ácido linolénico.

Para este análisis, fueron colocados en una cubeta de cuarzo los siguientes elementos: 1.2ml de tampón de fosfato de sodio 0.2M (pH 7.0), 0.3ml de azul de metileno 0.1mM, 0.3ml de ditioneitol (DTT) 0.2M en buffer de fosfato de

sodio 0.2M (pH 7.0) –preparado siempre antes del ensayo-, 0.3ml de acetona, 0.45ml de la mezcla de sustrato, y 0.45ml de extracto de enzima, consiguiendo un volumen de reacción de 3ml. La reacción fue iniciada al añadir el extracto de enzima y medida a 660nm por 3 minutos a 25°C usando un espectrofotómetro Lambda 40 (Perkin Elmer). Una unidad de actividad enzimática fue definida como el cambio en la absorbancia 1.0/min a 660nm, bajo las condiciones del ensayo. La actividad fue expresada en Unidades · mg Proteína⁻¹ · min⁻¹

5.4.6 Proteína total

Para determinar la actividad enzimática específica fue necesario cuantificar la proteína total de las muestras. Para dicha determinación se utilizó el método reportado por Bradford, (1976) adaptada para microplacas siguiendo las instrucciones del reactivo de Bradford de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Se vertieron 10µl de extracto enzimático en cada pocillo, seguidos de 250µl de reactivo de Bradford. Esta reacción fue agitada por 30 segundos y luego incubada por 30 minutos. Después de este tiempo, se midió su absorbancia a 595nm en un lector de microplacas iMark™ (Bio-rad Laboratories Inc., Germany).

5.5 Extracciones hidrofílicas de compuestos fitoquímicos

Los extractos hidrofílicos fueron obtenidos para la determinación de fenoles totales (FT), flavonoides totales (FLT) y para evaluar la capacidad antioxidante (CAOX) siguiendo el método de Corral-Aguayo et al. (2008) con ligeras modificaciones. Se tomaron muestras de 0.5g de pulpa liofilizada y se homogeneizaron en 10ml de metanol al 80% utilizando un homogeneizador Ultra Turrax T25 (Ika Works, Wilmintong, NC) temperatura ambiental (TA, 24-27°C). El homogeneizado fue sonificado por 5 min a TA en un baño ultrasónico de 40 kHz (Bransonic CPX, 2510). Después, los extractos se centrifugaron a 20, 984 x g por 5 min a 2°C. El

sobrenadante fue separado y reservado; el residuo fue sometido a una segunda extracción usando el mismo procedimiento. Ambos sobrenadantes fueron mezclados, y se midió su rendimiento en mililitros.

5.5.1 Contenido de fenoles y flavonoides totales

Para medir el contenido de fenoles totales se utilizó el método publicado por Corral-Aguayo et al (2008) con ligeros cambios. Se colocaron 30µl de muestra en un pocillo de microplaca, seguido de 150µl de reactivo Folin-Ciocalteu (dilución 1:10) y 120µl de Na₂CO₃ al 7.5% (p/v). La reacción fue incubada por 90 minutos en ausencia de luz y su absorbancia fue medida a 630nm utilizando un lector de microplacas iMark®. Los resultados fueron expresados en microgramos equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g de peso seco (p.s.). Como blanco de referencia, se utilizó metanol al 80%.

El contenido de flavonoides totales fue determinado utilizando la técnica reportada por Yang et al. (2009) con ligeras modificaciones. En un tubo eppendorf se colocaron 10µl de extracto, 400µl de agua destilada y 30µl de NaNO₂ (1:20 p/v). Después de 5 minutos de incubación, se añadieron 30µl de AlCl₃ (1:10 p/v). Después de 6 minutos, se añadieron 200 µl de NaOH 1M. Finalmente, la mezcla fue diluida con 240µl de agua destilada. Su absorbancia fue medida a 415nm en microplaca, utilizando el lector arriba mencionado. Los resultados fueron expresados en microgramos equivalentes de quercetina (EQ)/100g p.s. Como control de la reacción se utilizó metanol al 80%.

5.5.2 Actividad antioxidante

El análisis de inhibición del radical DPPH se realizó siguiendo la metodología utilizada por Jiménez-Escrig et al., (2000) con ligeros cambios. Se colocaron alí-

cuotas de 280µl de DPPH 100µM en metanol, y se añadieron 20µ de extracto hidrofílico. Las reacciones se incubaron por 30min en ausencia de luz, y su absorbancia fue medida a 515nm en un lector de microplacas iMark®. Los resultados fueron expresados como microgramos equivalentes de Trolox (ET)/100g p.s.

La inhibición el radical ABTS se realizó siguiendo la metodología reportada por Re et al. (1999) con adaptaciones para ser realizada en microplaca. Para generar el radical ABTS se mezcló una solución de ABTS 7mM con $K_2S_2O_8$ 140mM, hasta que éste último consiguió una concentración final de 2.45mM. La reacción se dejó en refrigeración (4°C) durante 16 horas para su equilibrio. Después de este lapso, se ajustó la absorbancia de la solución a 0.7 ± 0.02 añadiendo metanol. En una microplaca, se añadieron 230µl del radical ABTS y 30µl de extracto hidrofílico. Esta reacción se dejó equilibrar por 7 minutos en ausencia de luz, y luego fue medida su absorbancia a 734nm en el lector de microplacas mencionado anteriormente. Los resultados fueron reportados en microgramos equivalentes de Trolox (ET)/100g de p.s.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de los frutos

Los frutos fueron cosechados el 02 de Febrero del 2017, en la zona aguacatera de Uruapan en el huerto orgánico certificado, con registro SAGARPA HUE08161022399 con ubicación en Uruapan Michoacán (N 19° 23' 04", W 102° 05' 38"). Se cosecharon directamente del árbol, de tamaño y color uniformes. En los análisis de recepción del fruto, se clasificaron en estado de madurez No.1, de acuerdo a la guía visual utilizada; asimismo la firmeza inicial media fue 176.5N y un contenido de materia seca promedio del 33.5%. Estos frutos tuvieron un peso promedio de 195 gramos, que los ubica en la categoría "primera" para el mercado Mexicano; 60 o 22, para EE.UU y Europa, respectivamente, de acuerdo a la tabla de clasificación publicada por la APEAM A.C. y la norma mexicana NMX-FF-008 (DOF, 1982). Los frutos con defectos fueron descartados y se incluyeron únicamente frutos de *calidad suprema* de acuerdo a la NMX-FF-016-SCFI-2006 (DOF, 2006).

6.2 Color

6.2.1 Color Externo

En la Tabla 3 se pueden observar los resultados de los parámetros en el día 0 y en ambas transferencias. En el espacio de color, el parámetro L^* determina, por un lado, la luminosidad y, por tanto, el brillo del fruto. En sus valores más bajos, determina el cambio hacia tonalidades oscuras.

Durante la tercer transferencia los tratamientos de orégano y tomillo a 3ml/l (Or3 y Or5, respectivamente) mostraron una disminución en los valores de L^* , disminución asociada a la pérdida de brillo, así como con una ganancia de colores oscuros, lo que podría significar que estos dos tratamientos presentaron

cambios hacia tonalidades oscuras, cambio asociado a la variedad 'Hass' durante su maduración.

En esta caso, estos dos tratamientos anteriores mostraron los valores más bajos, mientras que el resto presentaron los valores más altos sin presentarse valores intermedios.

En comparación al día cero, en ambas transferencias se mostró una pérdida de valores en este parámetro, excepto para los tratamientos de orégano y tomillo a 3ml/l los cuales presentaron, en el primer caso, una disminución más gradual; en el caso de este último, este no presentó diferencias respecto al control en ninguna de las transferencias.

El parámetro a^* se refiere al rango de colores que van del verde, en sus valores negativos, hacia el rojizo, en sus colores positivos. Sin embargo, pequeñas pérdidas de valor a^* pueden estar más asociadas a la pérdida de clorofila o solapamiento de la misma por otros pigmentos como las antocianinas (Cox et al., 2004). En este caso, podemos observar que entre el día 0 y las transferencias sí hubo una diferencia significativa, siendo el Día 0 el muestreo que tuvo los valores negativos de este parámetro, con colores más tendientes al verde. Sin embargo, entre las transferencias a los 16 y 23 días no se mostraron diferencias con respecto al control, por lo que se puede considerar que el tratamiento no afecta a los frutos en esta etapa.

Respecto al efecto de los tratamientos, se observó que no hay diferencias prácticas entre ellos, en ninguno de los muestreos realizados.

Tabla 3. Resumen de datos de color externo del día 0 comparado con transferencias a temperatura ambiente.

	Tratamiento	L*	a*	b*
0 Días	Control Negativo	^A 31.28 ± 2.30 ^a	^A -4.18 ± 1.79 ^a	^A 10.79 ± 2.99 ^a
	Control Positivo	^A 29.85 ± 2.12 ^{ba}	^A -4.98 ± 1.28 ^a	^A 10.69 ± 2.72 ^a
	Orégano 3ml /l	^C 27.99 ± 1.46 ^a	^A -2.47 ± 1.07 ^a	^A 7.30 ± 2.18 ^a
	Orégano 5ml /l	^{AB} 30.12 ± 2.85 ^a	^A -3.95 ± 2.84 ^a	^A 10.33 ± 4.43 ^a
	Tomillo 3ml /l	^{AB} 28.27 ± 3.79 ^a	^A -3.45 ± 2.51 ^a	^A 7.54 ± 2.92 ^a
	Tomillo 5ml/l	^{AB} 29.70 ± 2.73 ^a	^A -3.85 ± 1.63 ^a	^A 9.31 ± 2.53 ^a
16 + 3 días	Control Negativo	^A 26.58 ± 0.95 ^b	^A 1.71 ± 0.53 ^b	^A 3.00 ± 1.29 ^b
	Control Positivo	^A 26.60 ± 1.56 ^b	^A 1.25 ± 0.71 ^b	^{AB} 3.10 ± 1.24 ^b
	Orégano 3ml /l	^A 26.96 ± 1.35 ^{ab}	^A 0.95 ± 0.69 ^b	^{AB} 3.89 ± 1.26 ^b
	Orégano 5ml /l	^A 27.43 ± 2.48 ^b	^A 0.53 ± 1.89 ^b	^B 5.27 ± 3.26 ^b
	Tomillo 3ml /l	^A 29.95 ± 1.74 ^b	^A 0.78 ± 1.26 ^b	^{AB} 2.94 ± 1.72 ^b
	Tomillo 5ml/l	^A 26.52 ± 1.99 ^b	^A 1.12 ± 0.68 ^b	^A 3.35 ± 1.64 ^b
21 + 3 días	Control Negativo	^{AB} 26.9 ± 1.08 ^b	^A 0.33 ± 0.91 ^b	^A 2.35 ± 1.20 ^b
	Control Positivo	^{AB} 27.41 ± 1.08 ^b	^A -2.45 ± 2.08 ^b	^A 3.43 ± 1.17 ^b
	Orégano 3ml /l	^C 26.34 ± 0.81 ^b	^A -0.32 ± 1.30 ^b	^A 2.86 ± 0.67 ^b
	Orégano 5ml /l	^{AB} 26.98 ± 0.64 ^b	^A -1.76 ± 1.89 ^b	^A 3.12 ± 0.94 ^b
	Tomillo 3ml /l	^C 26.38 ± 1.66 ^a	^A -0.77 ± 1.79 ^b	^A 2.78 ± 1.40 ^b
	Tomillo 5ml/l	^A 27.57 ± 1.01 ^b	^A 1.49 ± 1.77 ^b	^A 3.07 ± 1.09 ^b

Los resultados se presentan como la media de dos muestras independientes ± la desviación estándar (DE). Las letras en mayúscula representan las diferencias entre los tratamientos dentro de un mismo muestreo. Las letras minúsculas representan diferencias de un mismo tratamiento entre muestreos. Las diferencias fueron calculadas utilizando la prueba de Tukey (p≤0.05).

6.2.2 Color Interno (clorofila total).

En la Tabla 4 gráfica de tendencias se muestran los resultados de los muestreos al día 0 y a los 21 días. En el análisis estadístico de estos resultados, no se observaron cambios a lo largo del periodo de almacenamiento en el color de la pulpa, expresado como el contenido de clorofila (mg) por mililitro de extracto de la muestra.

Tabla 4. Análisis de color interno.

Tratamiento	Almacenamiento (6°C, 95%HR)		Transferencias a TA	
	0 días	21 días	16 + 3 días	21 + 3 días
Control Negativo	0.029 ± 0.01 ^a	0.024 ± 0.008 ^a	0.044 ± 0.036 ^a	0.040 ± 0.029 ^a
Control Positivo	0.034 ± 0.03 ^a	0.092 ± 0.135 ^a	0.030 ± 0.015 ^a	0.037 ± 0.038 ^a
Orégano 3ml/l	0.065 ± 0.04 ^a	0.076 ± 0.061 ^a	0.038 ± 0.010 ^a	0.033 ± 0.014 ^a
Orégano 5ml/l	0.034 ± 0.01 ^a	0.033 ± 0.020 ^a	0.019 ± 0.014 ^a	0.046 ± 0.019 ^a
Tomillo 3ml/l	0.058 ± 0.04 ^a	0.015 ± 0.004 ^a	0.035 ± 0.015 ^a	0.036 ± 0.021 ^a
Tomillo 5ml/l	0.035 ± 0.02 ^a	0.014 ± 0.007 ^a	0.032 ± 0.012 ^a	0.044 ± 0.019 ^a

Los resultados se presentan como la media de dos muestras independientes en mg de clorofila/ml ± la desviación estándar (DE). Las letras indican diferencias significativas calculadas utilizando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Durante las transferencias a temperatura ambiente tampoco se encontraron diferencias entre los tratamientos (datos no mostrados).

Platt-Aloia and Thomson, (1981), analizaron tejidos de mesocarpio de aguacate 'Hass' y descubrieron que los plástidos tienen diferentes estructuras según su ubicación en el mesocarpio, lo que reconoceríamos como el cambio gradual de amarillo a verde en un corte transversal de mesocarpio, pero dichas estructuras plastídicas no cambian durante la maduración del fruto. A partir de estas observaciones, asocian el cambio en el color de la pulpa con el grado de penetración de luz y con el proceso de maduración. De esta manera, la falta de diferencias entre los tratamientos, podría ser asociada a la variabilidad de los frutos conferida por distintos factores como ubicación en los árboles antes de su cosecha u otros, como los medioambientales, o del manejo de árbol aguacatero (Rivera et al., 2017). Estos resultados podrían explicar la falta de cambios de color en la pul-

pa, medida como clorofilas totales, por lo que la variabilidad podría explicarse a los factores reportados por estos autores.

6.3 Firmeza y pérdida de peso

6.3.1 Firmeza

6.3.1.1 Firmeza durante el almacenamiento.

Como se puede observar en la Figura 5, al día 0 el fruto con recubrimiento y AE de Tomillo a 5ml/L ya presentaba una ligera pérdida de firmeza; sin embargo, esta pérdida no fue consistente con el tratamiento a lo largo de los muestreos.

En el resto de los muestreos no se observaron diferencias sino hasta el día 21, en el que el control positivo (135 N), presentó una diferencia significativa respecto al control negativo (20.33 N), utilizando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), mientras que el resto de los tratamientos no mostraron diferencias.

Aunque se redujo la firmeza durante los muestreos, no se observaron diferencias significativas o prácticas entre los tratamientos.

Mendieta et al., (2016) usó un recubrimiento a base de carnauba y shellac, y reportó una firmeza similar al control positivo usado en este experimento tanto en frutos de aguacate 'Hass' recubiertos y no recubiertos (110-120N) almacenados a 3°C durante 24 días. Sin embargo, cabe resaltar que a los 24 días, sus frutos mostraron entre el 14 y 18% de daño interno, mientras que los usados en este estudio, no mostraron daños internos en un periodo de 21 días. Sin embargo, una mayor cantidad de daños internos en los frutos utilizados en el estudio citado, podría estar asociada a una mayor aparición de desórdenes metabólicos en frutos de cosecha temprana (22-26% de materia seca) durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Wang, 2010).

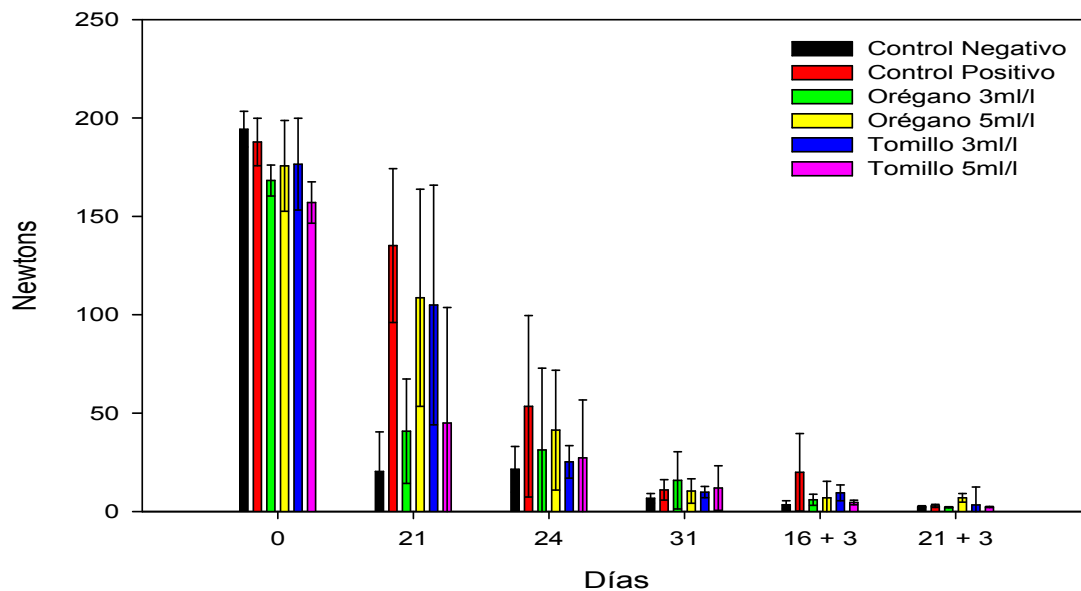


Figura 5. Firmeza durante el almacenamiento a 6°C y transferencias a 25°C

Zhang et al., (2013) presentó resultados de frutos 'Booth 7' tratados con 1-MCP, en el que a los 16 días la firmeza se encontró entre 12-21N, siendo el control negativo de su experimento el que tuvo el nivel más bajo (12N) y el tratamiento con 1-MCP el más alto (21N). En esta variedad de manejo orgánico, los resultados fueron diferentes ya que el control negativo disminuyó hasta los 20N a los 21 días y el positivo a 135N.

En la Figura 5 se puede observar que durante ambas transferencias no hubo diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, sí hubo una diferencia entre ambas transferencias, presentando la primera una mayor media de firmeza (8.4 N) comparada con la segunda (3.32N).

Durante la maduración, las células de mesocarpio de aguacate sufren una gradual degradación de las paredes celulares debido a diferentes factores, lo que resulta en una mayor fragilidad a la ruptura, sin cambios significativos en su organización y compartimentación (Platt-Aloia and Thomson, 1981). Estos cambios

están asociados a su pérdida gradual de firmeza durante la maduración y senescencia del fruto. Sin embargo, ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo para reducir la pérdida de firmeza al durante las transferencias a temperatura ambiente, a pesar de los mayores valores de firmeza conseguida durante el almacenamiento por el tratamiento control.

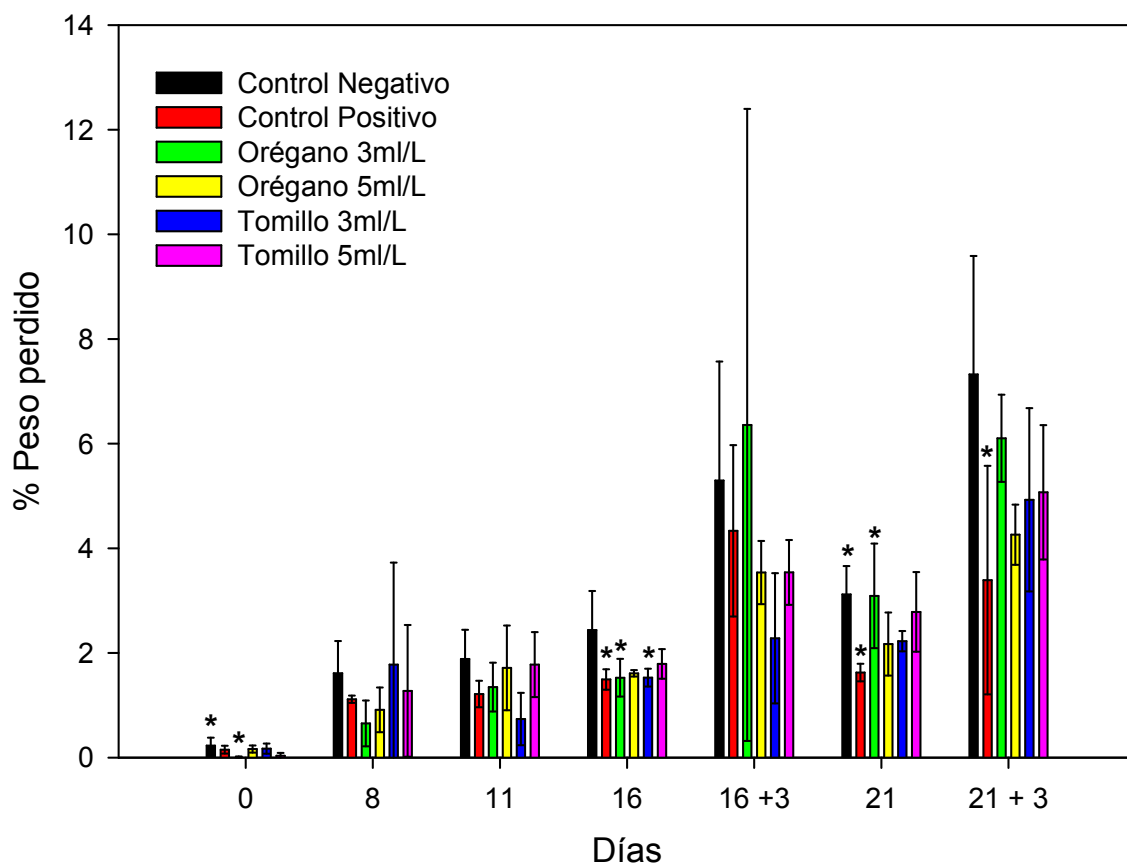
6.3.2 Pérdida de peso

6.3.2.1 Durante almacenamiento

Durante cada muestreo se observó un incremento en el porcentaje de peso perdido a lo largo del tiempo. En la Figura 6, se puede observar esta tendencia, con la excepción del día 4 al 16 en el que no se advirtieron cambios significativos.

A las 10 horas del día 0, se observaron pequeñas diferencias de peso entre el control negativo, el cual tuvo la mayor pérdida de peso, mientras que el tratamiento con orégano 3ml/l tuvo la menor pérdida. Sin embargo, las pérdidas de peso se ubicaron por debajo del 1%. Estos valores se mantuvieron por debajo ese valor hasta el día 8, muestreo en que lo sobrepasaron.

Aunque entre los días 8, 11 y 16 no hubo diferencias en la pérdida de peso entre los muestreos, el día 16 se advirtió una diferencia de peso entre los tratamientos. En este muestreo el control positivo, orégano 3ml/l y tomillo 3ml/l mostraron, por igual, la menor pérdida de peso. Sin embargo, esta observación no se sostuvo consistentemente en los siguientes muestreos, excepto para el control positivo, que sostuvo una menor pérdida de peso también a los 21 días. En cambio, orégano 3ml/L presentó, contradictoriamente, una mayor pérdida de peso en este mismo muestreo junto con el tratamiento control.



Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos respecto a las figuras que no los tienen. Estas diferencias fueron calculadas usando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Figura 6. Porcentaje de pérdida de peso durante almacenamiento a 6° y transferencias a TA

Al día 21, los frutos del control positivo mostraron la menor pérdida de peso (1.6%) respecto al control negativo y orégano 3ml/l (3.1%). En este muestreo, el resto de los tratamientos, observaron una menor pérdida respecto al control negativo (2.2 -2.7%).

Mendieta et al., (2016) utilizó una cera a base de carnauba y shellac, y reportó un rango de valores de pérdida de peso (2.6-4.6%) similares a los resultados encontrados en este trabajo. Sin embargo, en el estudio citado, los frutos fueron almacenados a 3°C durante 24 días.

6.3.2.2 Pérdida de peso en transferencias

En la Figura 6 se presentan los resultados de las transferencias a temperatura ambiente. Como puede advertirse, ambas transferencias se comportaron de manera similar en ambas transferencias. Ahora bien, en la segunda transferencia el control positivo mostró una reducción significativa de pérdida de peso respecto al control negativo.

Aunque a lo largo del almacenamiento se observaron diferencias en la reducción de pérdida de peso, el control positivo (recubierto sin aceite esencial añadido) fue el que presentó la menor pérdida de peso sostenida a partir de los 16 días y que se presentó también en la transferencia a los 21 días. Este tratamiento se perfiló como la mejor alternativa para reducir la pérdida de peso entre los tratamientos utilizados.

La imperceptible efectividad de la adición de aceites esenciales en el recubrimiento utilizado podría ser explicada por una interacción no caracterizada entre los componentes de ambas sustancias, la cual podría, como se observó, reducir la capacidad para limitar consistentemente la pérdida de humedad del fruto. Sin embargo, mayor investigación hace falta para comprender la dinámica de la mezcla formada y sus funciones de barrera.

6.4 Actividad enzimática

6.4.1 Catalasa

En las Figura 7 se puede observar que en caso de los tratamientos, no se presentaron diferencias significativas durante todo el almacenamiento, por lo que se deduce que éstos no tuvieron efecto elicitor sobre la CAT. Sin embargo, valores de medias más altos se pueden observar a las 10 horas en relación a la hora 0, con valores aumentados en el rango 28-200%, mismos que se mantuvieron esta-

bles a lo largo del almacenamiento. Nuevos experimentos con muestras mayores hacen falta para confirmar esta aparente tendencia, la cual podría estar influenciada por la disminución de temperatura (Imahori et al., 2008; Sala and Lafuente, 2000; Zhao et al., 2009).

Resultados diferentes fueron presentados por Sellamuthu et al. (2013), quien encontró un aumento en la actividad enzimática utilizando vapores de AE de tomillo directamente sobre la fruta, almacenada por 6 días.

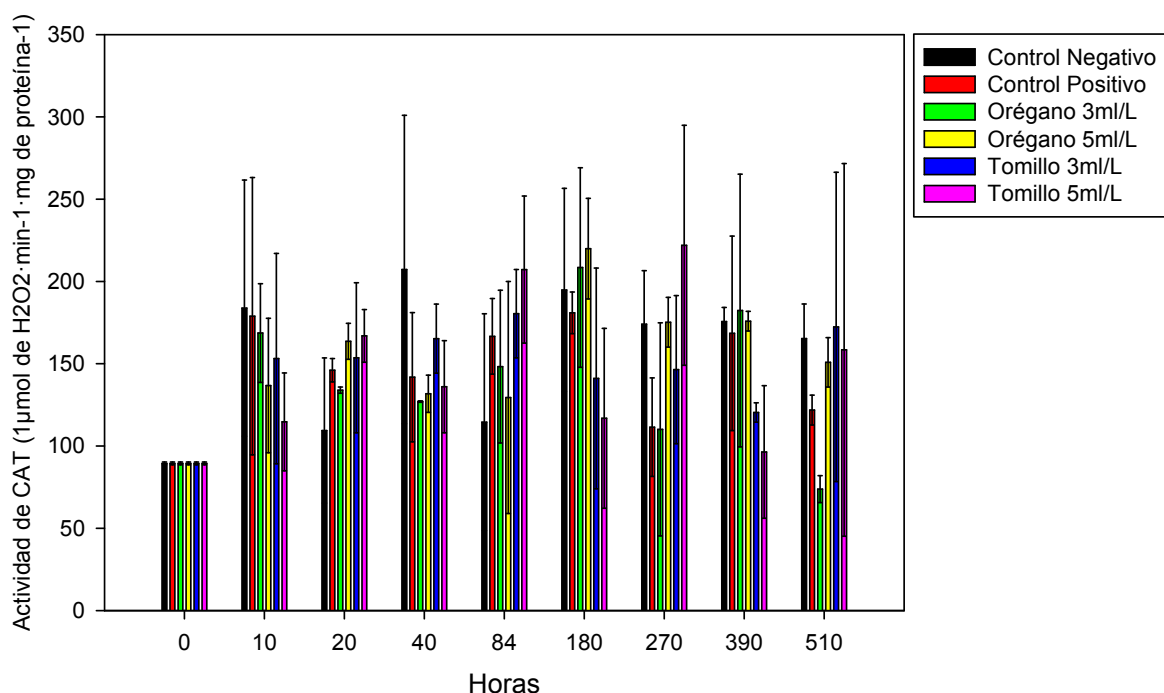


Figura 7. Actividad de Catalasa durante almacenamiento a 6°C

Por otro lado, Zhang, et al. (2013) encontraron que en frutos variedad 'Booth 7' tratados con 1-MCP la respuesta de CAT fue una actividad estable, en la que no se presentaron cambios de actividad hasta los 18 días que esta aumentó.

Djami-Tchatchou et al., (2013) observaron un incremento en la regulación (*up regulation*) del gen de catalasa en los frutos de aguacate 'Hass' cosechados como respuesta tardía (*late response*), sin evaluar su actividad. Aunque esta respuesta sólo se observó en frutos infectados con *C. gloeosporoides*, no mostraron

resultados para identificar si los tratamientos de AE probados, producen una respuesta similar a nivel de actividad enzimática.

Finalmente, en el Anexo 1 se muestran las correlaciones para esta enzima con la firmeza y porcentaje de pérdida de peso fueron casi nulos ($r^2 = 0.08$ y 0.17 , respectivamente).

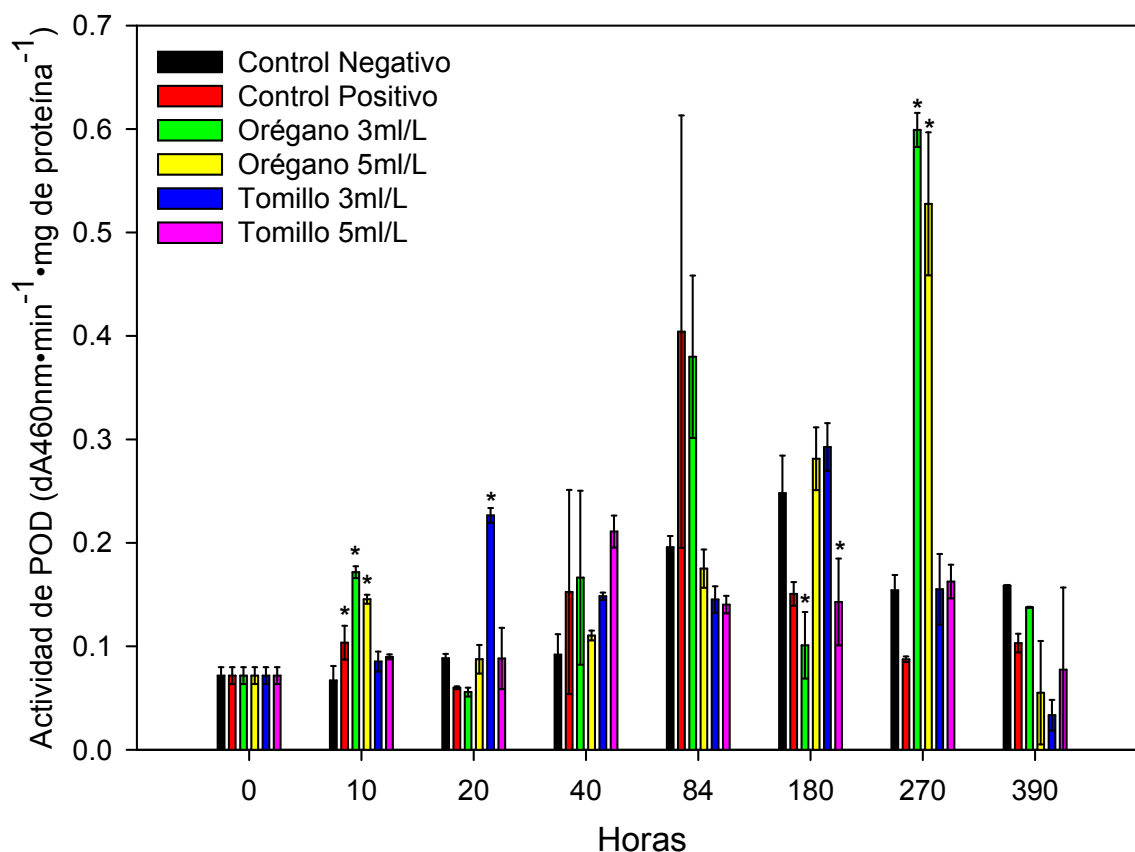
6.4.2 Peroxidasa

En la Figura 8 se puede observar que a las 10 horas, el control positivo (CP), Or3 y Or5 presentaron un aumento en la actividad de POD. Seguido de un segundo aumento a las 20 horas, causado por el tratamiento de tomillo a 3ml/L (To3). A las 180 horas ambos tratamientos de tomillo (To3 y To5) presentaron un incremento en la actividad, mismo que disminuyó en el siguiente muestreo, para dar paso a un aumento en Or3 y Or5.

Los resultados muestran que durante las primeras horas hay una estimulación directa de los tratamientos con AE de orégano y por la cera sin AE. Sin embargo, los tratamientos con AE de tomillo tuvieron una respuesta diferida, que podría estar relacionada, por una parte, con una posible interacción con la cera utilizada como vehículo y su liberación más lenta, hipótesis que podría explicar un segundo aumento en la actividad de POD por los tratamientos con AE de orégano a las 180 horas.

En estudios previos con plántulas de avena genéticamente modificadas para no resistir el estrés por frío, la actividad de las enzimas antioxidantes se vio disminuida a los 5 días (120 horas) al mismo tiempo que los niveles de H_2O_2 se elevaron. Estos resultados, demuestran que una baja capacidad para reducir ERO está correlacionada con una menor resistencia al estrés por frío, y una elevación en la actividad de la enzima POD podría ayudar a contrarrestar estas especies, alargando la vida útil del producto. Sin embargo, en este trabajo el aumento

la actividad de esta enzima no mostró una correlación alta particularizada con los parámetros de firmeza o el porcentaje de pérdida de peso durante el almacenamiento o las transferencias a TA ($r^2 = 0.01$ y 0.002 , respectivamente) como se muestra en el Anexo 2.



Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos. Estas diferencias fueron calculadas usando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Figura 8. Actividad de peroxidasa en almacenamiento a 6°C

Zhang et al., (2013) presentó un trabajo en el que frutos de la misma variedad tratados con 1-MCP mostraron un incremento casi 100 veces mayor en la actividad enzimática ($45-90 \text{ U} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$), incremento que se vio reflejado en una menor pérdida de firmeza en frutos comparados contra un control tratado con agua destilada. Los resultados indican que los cambios observados en este experimento, aunque muestran diferencias significativas, no son suficientemente altos

para representar diferencias prácticas en actividad enzimática capaces de tener un efecto sobre la firmeza y pérdida de peso.

6.4.3 Superóxido dismutasa

En la Figura 9 se muestra la actividad de esta enzima durante las primeras horas de almacenamiento a 6°C. A las 20 horas, se observó que el control positivo y el tratamiento To5 tuvieron una actividad más alta que el resto de los tratamientos.

A las 510 horas se muestra que hubo una diferencia de actividad, en la que el control positivo, Or5, To3 y To5, aumentaron la actividad de la enzima respecto al control negativo y Or3.

Por otro lado, Zhang et al., (2013) presentó un trabajo con frutos de la misma variedad utilizando 1-MCP. Sus resultados mostraron una mayor actividad de SOD ($45-90 \text{ U} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$). En cambio, Sellamuthu et al., (2013), realizó un estudio aplicando directamente vapores de tomillo en aguacate 'Hass'. En dicho trabajo, encontró actividades mucho más altas que las vistas en este estudio. Dichos resultados, podrían estar explicados por la aplicación directa de los vapores sobre los frutos. En este trabajo, el uso de una matriz acuosa con carnau-ba pudo estar relacionado, por una parte, a una liberación más lenta del AE o, por otro lado, a una interacción entre los componentes de la cera y el AE, lo que pudo haber reducido en gran parte el efecto de los tratamientos.

Respecto a su contribución al mantenimiento de la calidad en los frutos sujetos a experimentación, no se encontró una correlación entre la actividad de la enzima y los parámetros de firmeza y porcentaje de peso perdido ($r^2 = 0.2$ y 0 , respectivamente) como se muestra en el Anexo 3. En ambos estudios citados una mayor actividad mostró un efecto sobre el mantenimiento de la firmeza. Por lo que se puede considerar que se requieren una estimulación mayor de la actividad en-

zimática de superóxido dismutasa para conseguir un efecto perceptible en el mantenimiento de la calidad cuantificado como el grado de firmeza y la reducción en la pérdida de peso.

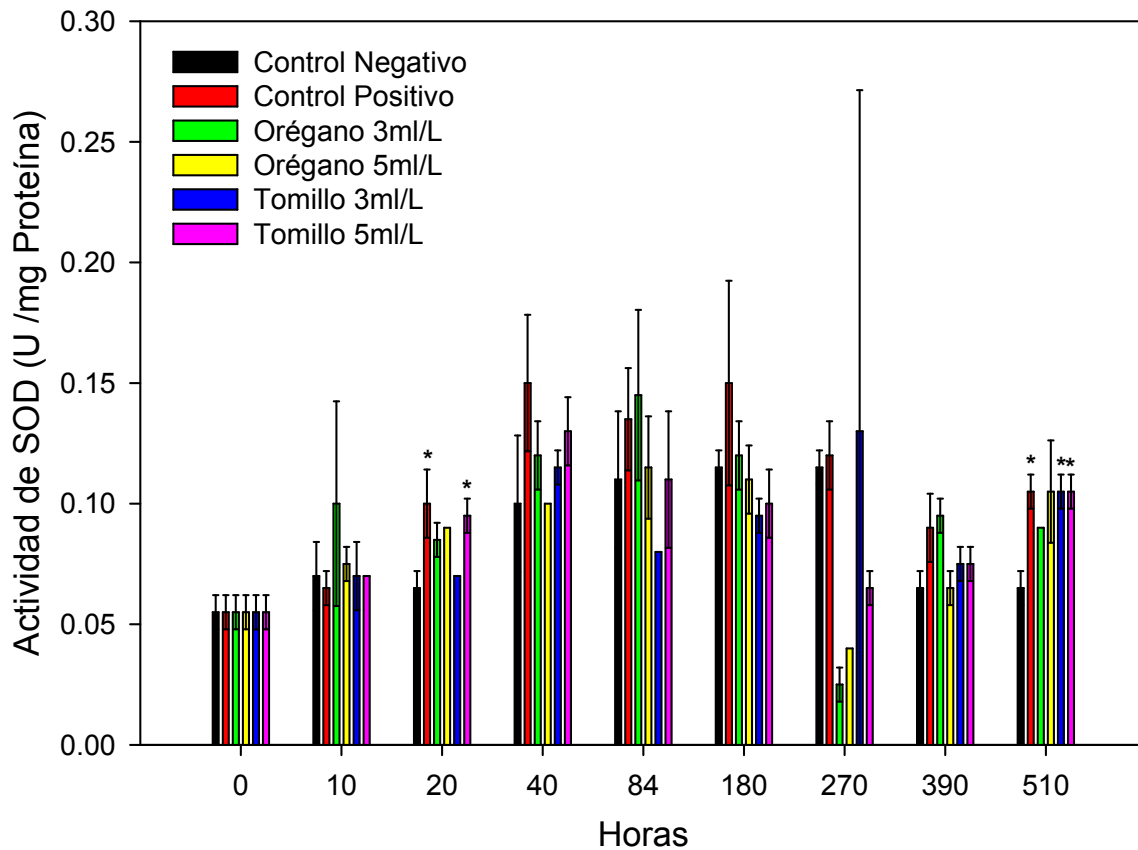


Figura 9. Actividad de superóxido dismutasa durante el almacenamiento a 6°C

6.4.4 Fenilalanina amonio liasa

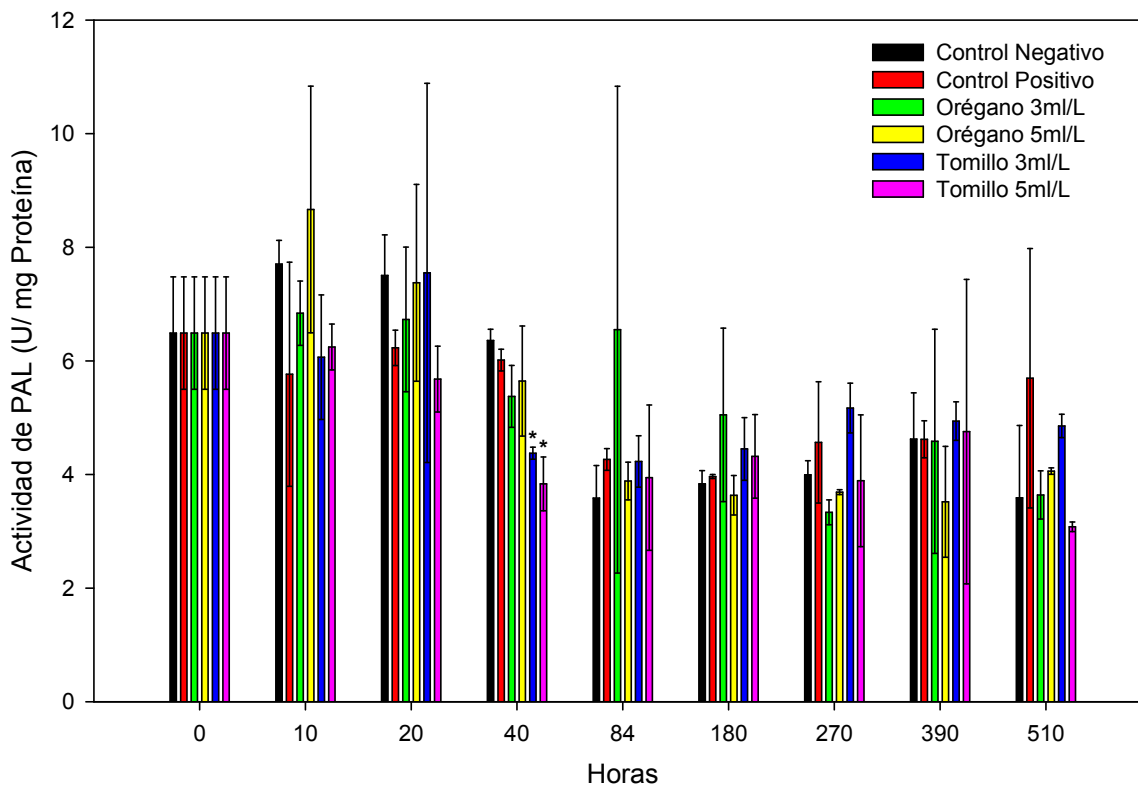
Nuestros resultados muestran que la actividad de PAL se mantuvo sin diferencias en los tratamientos con recubrimiento, mientras que en el control negativo, hubo una caída a en la actividad a partir de las 84 horas (Figura 10) que continuó hasta las 390 horas, en la que tuvo un ligero aumento de actividad, para luego disminuir de nuevo hacia las 510 horas.

Respecto a los tratamientos, se encontró que ambas concentraciones de AE de tomillo tuvieron la actividad más baja a las 40 horas, respecto al control negativo. En el resto de los muestreos, no se encontraron diferencias entre los tratamientos. De manera general, se puede advertir un ligero incremento en la actividad de esta enzima durante las primeras 40 horas; después de este tiempo, la tendencia fue a disminuir su actividad y mantenerse estable. Una actividad similar se reporta en mandarinas al ser almacenadas en refrigeración (Sanchez-Ballesta et al., 2000).²

En un trabajo previo (Bill et al., 2014), presentó resultados de un estudio con vapores de tomillo en aguacate 'Hass', en el que la actividad de PAL se vio duplicada al quinto día en frutos almacenados a 20°C. En otro estudio, (Sellamuthu et al., 2013a) encontraron que la actividad de PAL se incrementó casi 13 veces al combinar la exposición a vapores de AE de tomillo en con almacenamiento en atmósferas controladas, usando también la variedad 'Hass' almacenada a 10°C por 18 días. Aunque las condiciones de almacenamiento en ambos estudios fueron diferentes, se pudo observar el incremento en la actividad mediante la exposición directa a los vapores de AE. Por otro lado de Oliveira et al., (2017) descubrieron una mayor actividad de PAL en granadas de producción orgánica comparadas con otras producidas por métodos convencionales. A pesar de que este trabajo podría soportar una respuesta similar en frutos de aguacate, no hay estudios al respecto para este fruto. Ahora bien, MacLean et al., (2007) reportó que peras de la variedad 'Red d'anjou' ven inhibida la actividad de PAL al aplicar un bloqueador de los sitios activos de etileno (1-MCP). En el presente trabajo no se encontró un incremento en la actividad debida los tratamientos, sino un mantenimiento de la misma, respecto a la actividad del control negativo. La falta de diferencias entre los tratamientos y el control positivo, indica que el recubrimiento consigue este efecto independientemente a la adición de AE, por lo que podría especularse un posible efecto de barrera física que podría reducir la unión del etileno con sus receptores correspondientes. Aunque por otro lado, se abre nuevamente la posibilidad de una interacción interferente del recubrimiento con los, lo que po-

² Tendencia observada en los controles negativos de este trabajo.

dría impedir su liberación y actividad elicitora. Sin embargo, estudios específicos sobre estos tópicos quedan por ser realizados para confirmar esto.



Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos respecto. Estas diferencias fueron calculadas usando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Figura 10. Actividad de PAL durante las primeras 84 horas de almacenamiento

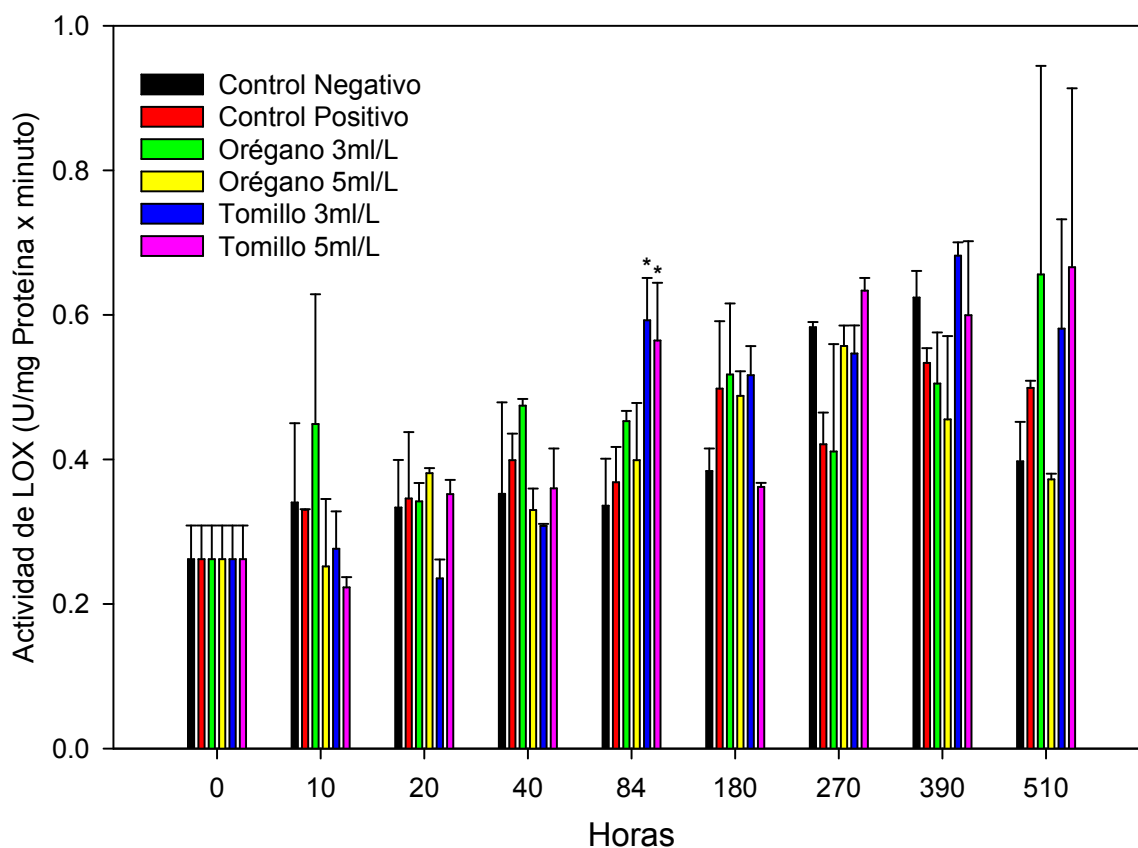
La actividad de esta enzima, no tuvo una aportación directa al mantenimiento de los parámetros de pérdida de peso ni a su firmeza ($r^2 = 0.21$ y 0.13 , respectivamente), como se muestra en la Anexo 4.

6.4.5 Lipoxigenasa

En la Figura 11 se muestran los resultados de la actividad de LOX en este trabajo. A las 84 horas se muestra un incremento en la actividad debido a la aplicación de ambos AE de tomillo, respecto al control negativo. Por otro lado, no se observaron diferencias respecto a los demás tratamientos y control negativo. (Bill et al., 2014) publicó un estudio donde demostraba que la aplicación directa de vapores de aceite de tomillo disminuyó la expresión de lipoxigenasa en aguacates de variedad 'Hass' y 'Ryan' almacenados por 21 días. Sin embargo, se encuentra ampliamente reportado que la variación en la expresión de un gen no se está directamente relacionada a su actividad, debido a que se requieren modificaciones post-traduccionales para que una proteína madure a su forma activa (Prabakaran et al., 2012). El estudio antedicho, no reporta la actividad de la enzima en sus resultados.

Este incremento en la actividad de lipoxigenasa podría ser útil para prevenir la colonización del hongo causante de antracnosis. Sin embargo, la evaluación de esto se encontró fuera de los objetivos de este trabajo.

Por otro lado, Karni et al., (1989), reportaron que un incremento de la actividad de esta enzima en frutos de variedad 'Fuerte' coincidió con una disminución en la firmeza en periodo de almacenamiento a 25°C por 6 días. En este trabajo se encontró un aumento significativo a partir de las 180 horas (7 días) en todos los tratamientos, sin embargo este no se vio reflejado directamente en los cambios de firmeza ($r^2 = 0.09$), como se muestra en el Anexo.



Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos respecto. Estas diferencias fueron calculadas usando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Figura 11. Actividad de lipoxigenasa en almacenamiento durante almacenamiento a 6°C

6.5 Análisis de metabolitos secundarios y actividad antioxidante

6.5.1 Contenido de fenoles solubles totales (FST)

En la Figura 12 se muestran los resultados de este análisis y sus diferencias respecto al control negativo. A las 10 horas de almacenamiento en refrigeración se observó una disminución generalizada del contenido de FST, pero a las 20 horas se observó que hubo un aumento en el contenido de fenoles en los frutos tratados con Or3 y To3, respecto al control negativo. Consecutivamente, se presentó un aumento en el contenido de FST a las 40 horas en el control negativo, que se diferenció de los otros tratamientos, excepto de To5.

A las 84 horas, se advirtió un nuevo aumento de la actividad del tratamiento tomillo 3ml/l (To3), el cual no se vio acompañado de Or3, como se vio a las 20 horas. Los niveles se mantuvieron sin cambios entre los tratamientos hasta las 270 horas, muestreo en que el control positivo mostró un aumento en el contenido de FST. A las 390 horas, el control negativo tuvo un nuevo aumento que lo diferenció de ambos tratamientos de tomillo. A las 510 horas no se observaron cambios entre los tratamientos.

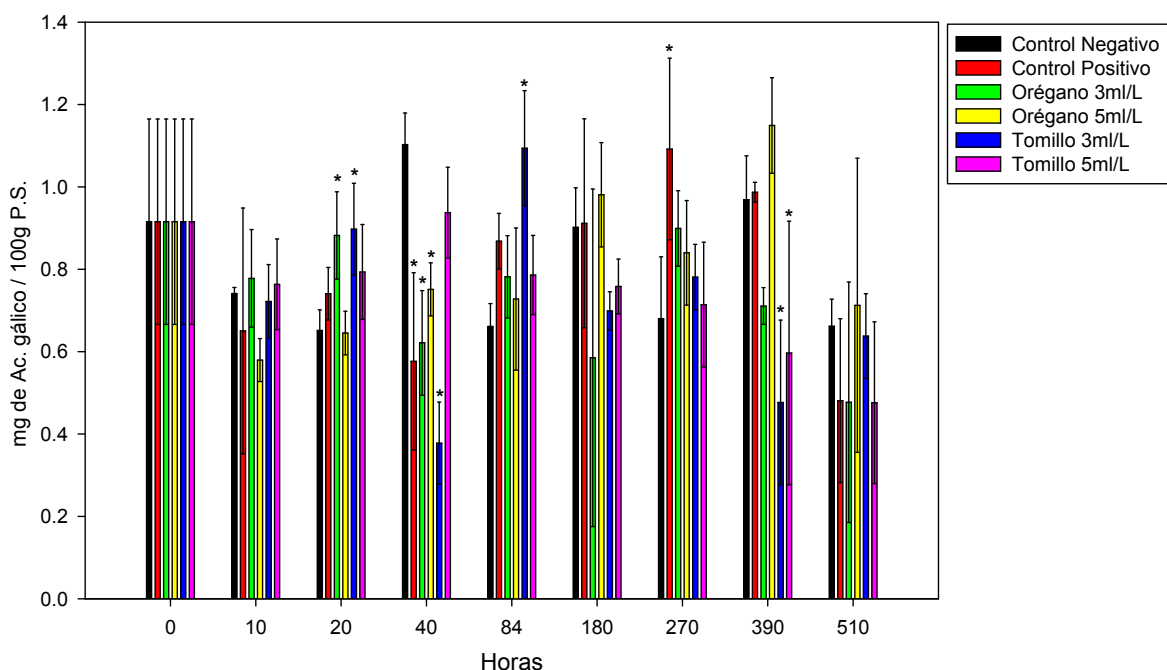


Figura 12. Contenido de fenoles solubles totales durante almacenamiento a 6°C

En esta figura se puede observar una tendencia oscilatoria entre los contenidos de, como una conducta de continua compensación a niveles variables de ERO, en los que la tendencia es la recuperación de los valores iniciales del experimento. Solamente el control negativo mostró valores significativamente más altos a las 40 horas, que el resto de los tratamientos.

Las ERO se acumulan con el paso del tiempo y hasta que este activa una reacción de contrapeso por parte de los diferentes sistemas enzimáticos y no enzimáticos del fruto (Saed-Moucheshi et al., 2014) estas tendencias se puede observar más claramente en la Figura 13, en la cual no se incluyen las variaciones y por lo tanto, las diferencias observadas en los análisis estadísticos. Sin embargo, sirve para ilustrar los cambios la tendencia arriba descrita.

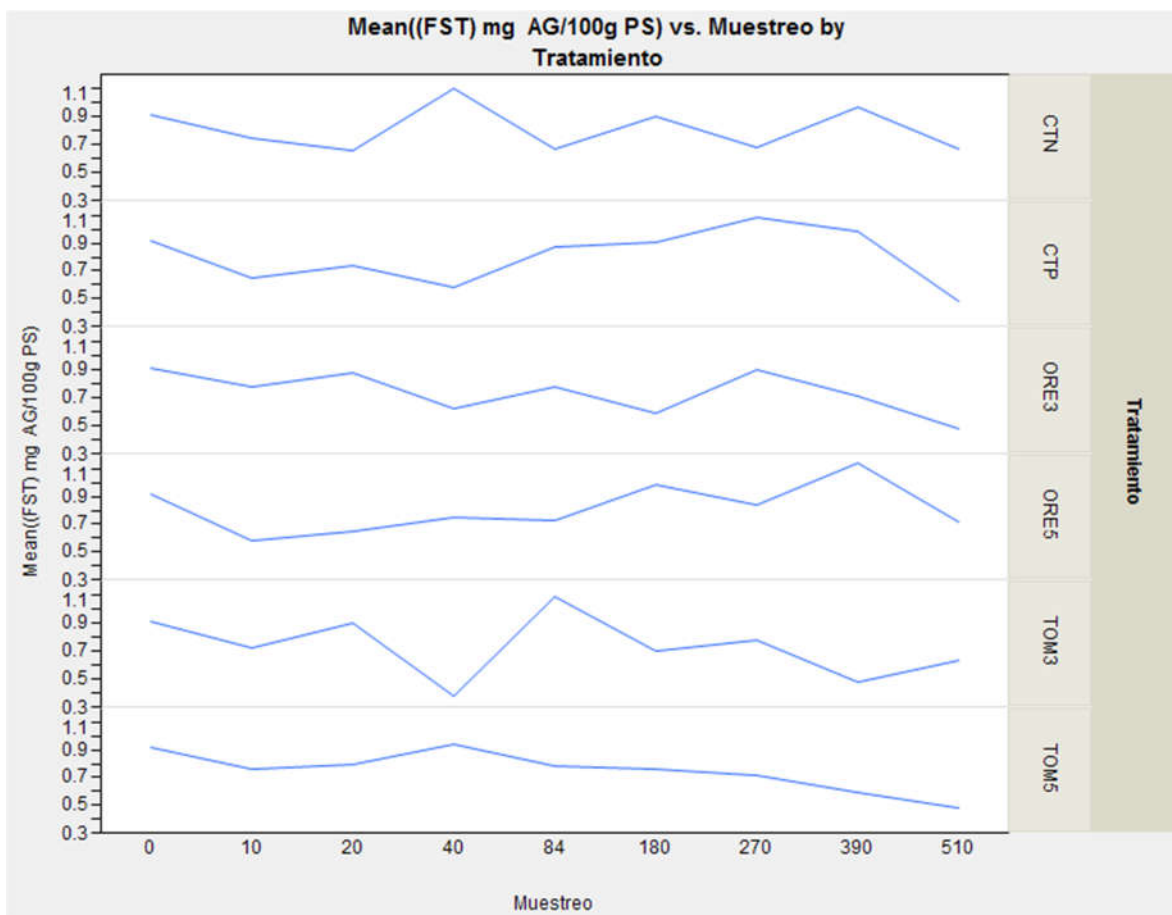


Figura 13. Oscilación en el contenido de fenoles solubles totales durante el almacenamiento.

Aunque PAL es la enzima reguladora de la formación de compuestos fenólicos la correlación encontrada con el contenido de FST fue demasiado baja ($r^2 = 0.01$). Por otro lado, el contenido de FST tuvo una baja correlación –Anexo 6-

con el mantenimiento de la firmeza ($r^2 = 0.08$) y con el porcentaje de peso perdido ($r^2 = 0.09$), por lo que no podría asegurarse un aporte importante al mantenimiento de la calidad poscosecha por el contenido de estos compuestos.

En otros trabajos (Saed-Moucheshi et al., 2014; Villa-Rodríguez et al., 2011) fueron reportados valores más de FST en aguacate de la misma variedad (~12 -30 mg de Catequina / 100g de peso fresco), pero sin uso de recubrimientos. En otro estudio Sellamuthu et al., (2013a), hacen una sola medición a los 18 días de almacenamiento, en el cual se reportan valores entre 0.45 y 0.78 mg de catequina / 100g de peso fresco, valores más cercanos a los observados en este experimento. Sin embargo, por la diferencia en los tiempos de muestreo, no se puede establecer una comparación fiel de resultados sobre las tendencias a lo largo del almacenamiento. La diferencia de valores y la alta variabilidad encontrada en este trabajo podría estar afectada por diferentes factores que incluyen los anteriores a la cosecha (*i.e.* nutrición, tipo de floración, etc.), fecha de recolección o inclusive el tamaño del fruto (Wang et al., 2012, 2016) que pudo ser diferente en los experimentos de los autores citados.

6.5.2 Contenido de flavonoides solubles totales (FLST)

Se ha demostrado ampliamente que una de las respuestas de las plantas a una fuente de estrés es la acumulación de flavonoides, entre otros compuestos con la misma función (Hodges, 2003). El contenido de flavonoides solubles también fue analizado durante los muestreos. En la figura 14 se muestran los resultados.

A las 20 horas se pudo observar también un aumento del tratamiento To3 por encima del control y del resto de los tratamientos.

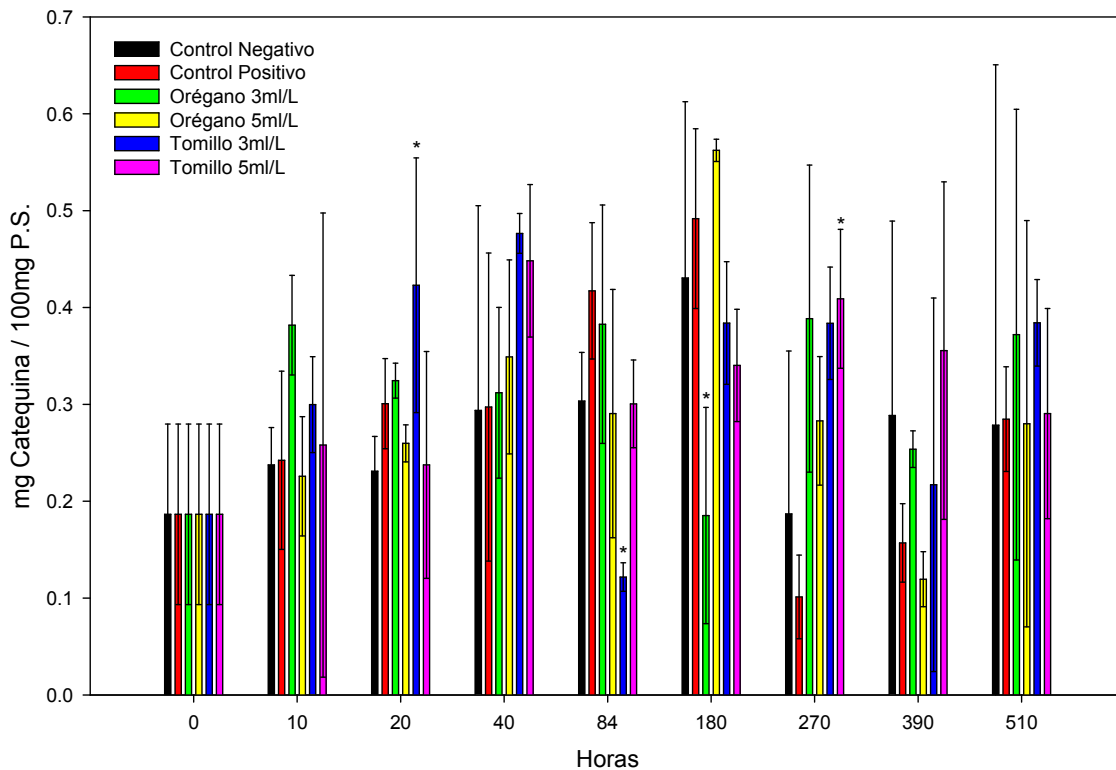


Figura 14. Contenido de flavonoides durante las primeras 40 horas de almacenamiento.

Este aumento coincidió con uno similar en el contenido de FST anteriormente descrito. A las 84 horas, este mismo tratamiento disminuyó el contenido de FLST. Y posteriormente no mostró diferencias con los demás tratamientos.

A las 180 horas, el tratamiento Or3 tuvo los valores más bajos que el control negativo y el resto de los tratamientos; y a las 270 horas, el tratamiento del To5 se diferenció del control negativo con valores más altos. Nuevamente, se presenta una gráfica (Figura 15) que muestra la oscilación descrita anteriormente con mayor claridad. En este gráfico se puede observar un patrón similar entre las medias del control negativo (CTN), control positivo (CTP) y orégano 5ml/L (ORE5). Sólo en el control positivo y en orégano 5ml/L el cambio fue significativo. Aunque los tratamientos de orégano 5ml/L, y ambos de tomillo, mostraron un aumento en sus medias a las 40 horas, sólo el aumento de Tomillo 3ml/l fue significativo.

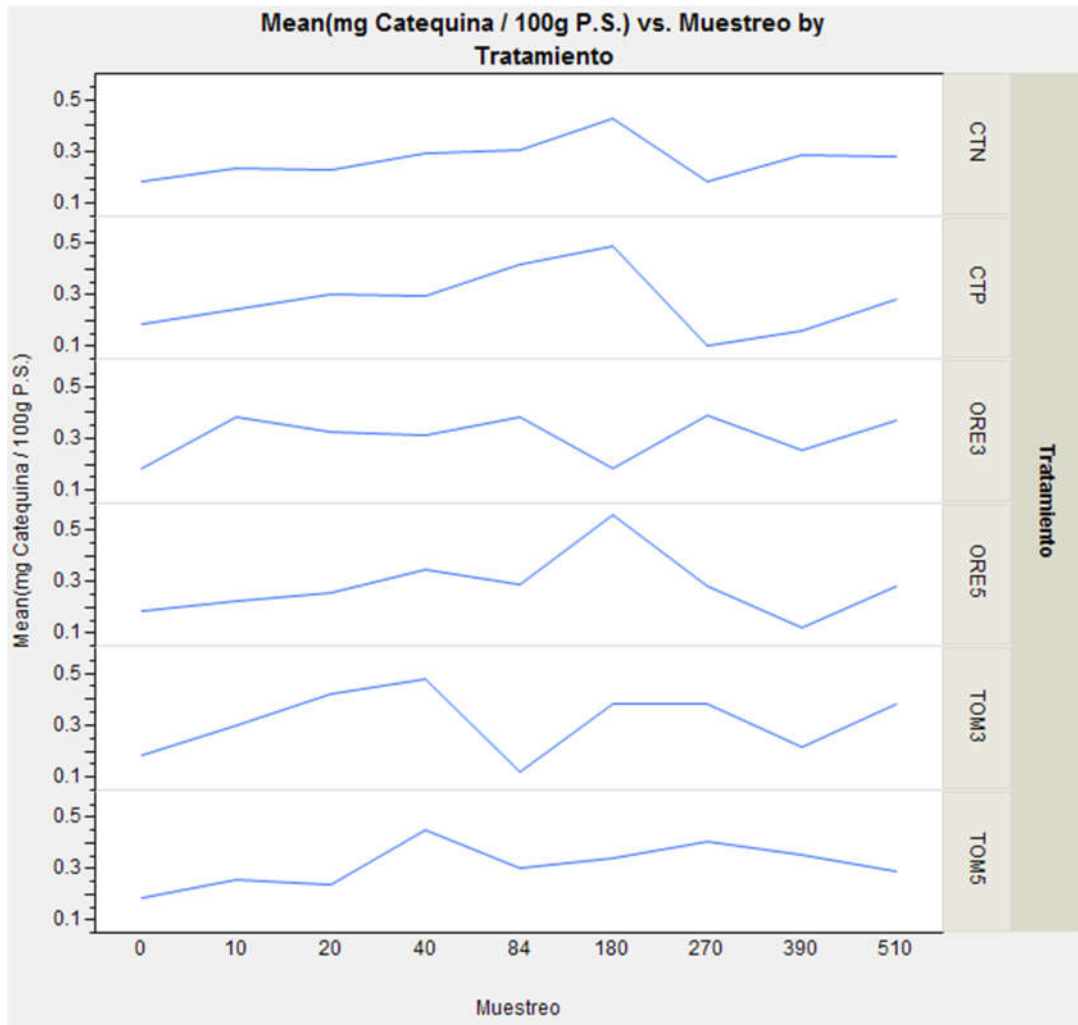


Figura 15. Comportamiento de los valores medios de flavonoides solubles totales durante el almacenamiento.

A diferencia del contenido de FST, en el caso del contenido de flavonoides totales sí se muestra un aumento generalizado de las medias con el paso del tiempo, sin embargo, el único tratamiento que mostró diferencias respecto al control negativo fue To3 a las 40 horas. Zhang et al., (2013) reportó una tendencia similar en frutos de la misma variedad analizados durante 20 días.

El control positivo, orégano 5ml/L (180 h) y tomillo 3ml/L (20 y 40 horas) muestran un aumento respecto a su control a la hora cero. Por lo que este último

tratamiento podría considerarse como el que estimula un incremento más temprano en el contenido de FLST.

Se hizo un análisis de correlaciones para saber si el contenido de FST tuvo contribuciones tanto al mantenimiento de la calidad, considerados como el mantenimiento de la firmeza y la pérdida de peso, sin embargo ambas correlaciones mostraron valores por debajo de cero ($r^2 = 0.0$ y 0.1), respectivamente (Anexo 7).

Al contrario de lo que podría esperarse, la actividad de la enzima PAL también tuvo una muy baja correlación con el contenido de FLST ($r^2 = 0.02$) en este trabajo.

6.5.3 Actividad antioxidante

6.5.3.1 DPPH

Para poder establecer una relación entre los parámetros de calidad y la actividad antioxidante de los frutos, esta también fue monitoreada a lo largo del almacenamiento. Como se muestra en la Figura 16, en las primeras 10 horas, ambos controles mostraron valores estables, en comparación con el resto de los tratamientos. A las 20 horas, los tratamientos a 3ml/L, orégano y tomillo, aumentaron significativamente. Sin embargo, a las 40 horas se vio el cambio más relevante en el tratamiento de To3, el cual mostró una media con el doble de capacidad antioxidante que el control negativo.

Cabe resaltar los muestreos de las 180 horas (7 días) y 270 horas (11 días) en los cuales el tratamiento de orégano a 3ml/L y el control positivo tuvieron las actividades más altas, respectivamente, en relación a su control negativo. En los posteriores muestreos, no se observaron aumentos significativos en la actividad antioxidante.

En el análisis diacrónico se muestra que el tratamiento de Tomillo a 3ml/L tuvo el aumento más relevante en su capacidad antioxidante medida por éste método.

En un estudio con frutos de la misma variedad 'Hass', pero con el uso de aceite esencial de tomillo y atmósferas modificadas, Sellamuthu et al., (2013a) encontró un ligero aumento en la actividad antioxidante medida por este mismo método, mismo que se pudo observar en el tratamiento de Tomillo 3ml/l a las 390 horas. Sin embargo, este autor solamente reporta un dato puntual medido a los 18 días, por lo que no permite apreciarse la variación que hay en la misma durante el almacenamiento.

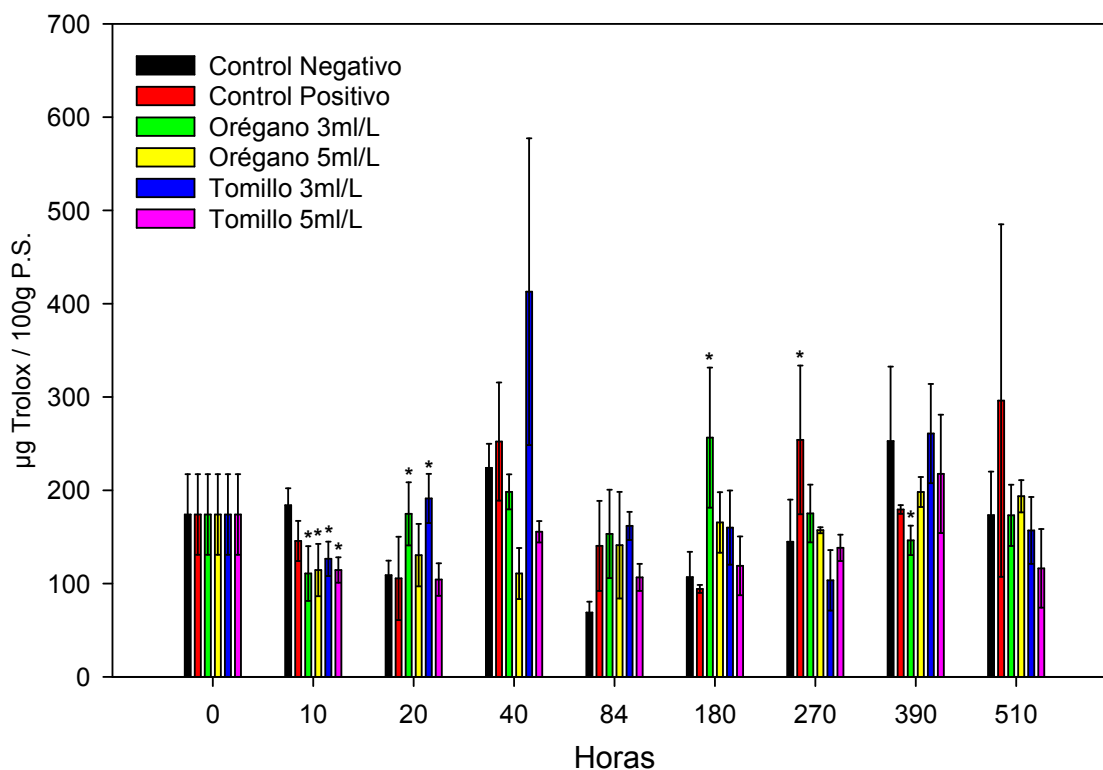


Figura 16. Contenido de fenoles solubles totales durante almacenamiento a 6°C

6.5.3.2 ABTS

En la actividad antioxidante medida por el método del radical ABTS (Figura 17) se observó un aumento en los valores durante las primeras 10 horas, en las que todos los tratamientos, excepto Or5 incrementaron. A las 20 horas, por el contrario, este último tratamiento mostró los valores más altos.

A las 40 horas, el control positivo y el tratamiento de tomillo 3ml/L tuvieron los valores más altos, coincidiendo éste último con los resultados obtenidos por el método de DPPH. A las 390 horas se observó que el control positivo tuvo una diferencia significativa respecto al control negativo con mayor actividad. Finalmente, a las 510 horas, los tratamientos de orégano 5ml/L, así como ambos de tomillo, tuvieron una caída en sus valores.

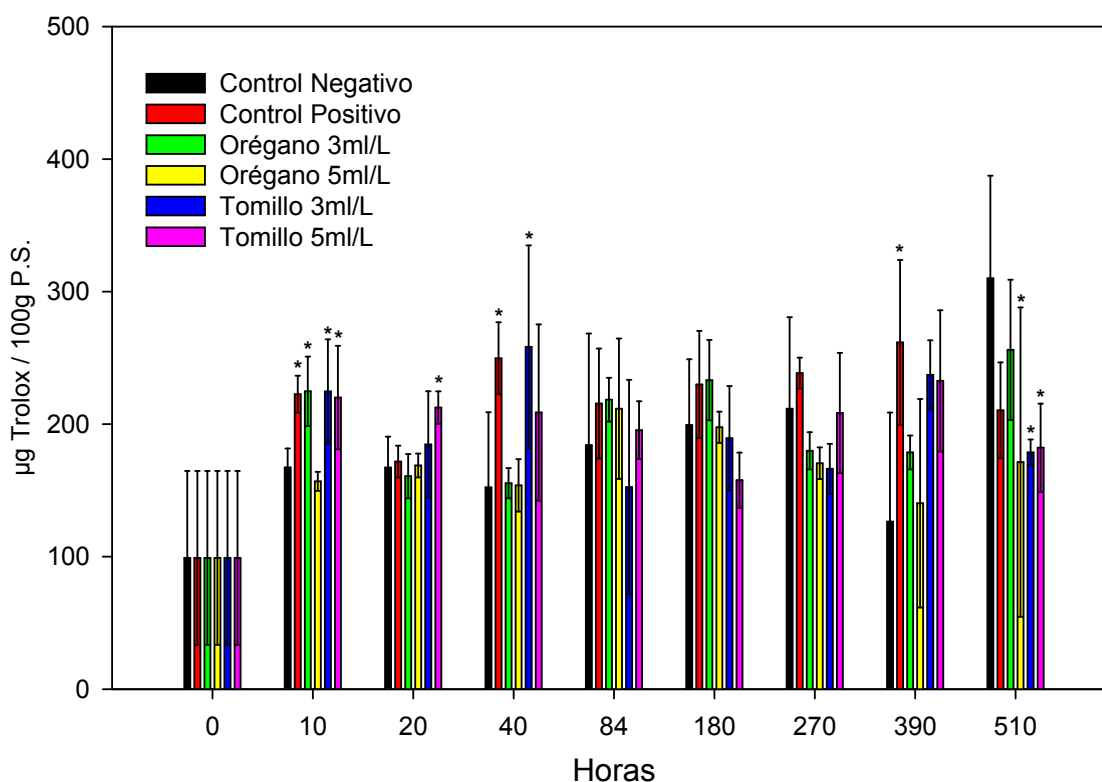


Figura 17. Actividad antioxidante medida con el radical ABTS durante almacenamiento a 6°C

Otros estudios han mostrado el método del radical ABTS como confiable para la medición de actividad antioxidante (Corral-Aguayo et al., 2008; Jiang et al., 2015). Sin embargo, no se encontraron estudios que mostraran resultados en frutos de la misma variedad para fines comparativos.

7. Conclusiones

El recubrimiento utilizado en este trabajo sin la aplicación de aceites esenciales fue el método más efectivo para mantener la firmeza por 21 días en almacenamiento. Este último recubrimiento (sin AE) y el tratamiento con aceite esencial de tomillo a 3ml/L fueron los tratamientos con menor pérdida de peso durante el almacenamiento.

Sin embargo, durante el estudio se encontró un alto nivel de variabilidad que podría ser explicado por el tiempo de cosecha y orientación espacial de los árboles y los frutos en ellos, como ha sido reportado recientemente. Por lo que se recomienda una estandarización en el muestreo que considere los factores como la floración a elegir, orientación espacial del fruto en el árbol y estadio del fruto, lo que implica el uso de un huerto controlado para evaluar estos cambios con mayor precisión.

Los tratamientos utilizados produjeron cambios oscilatorios de aumento y disminución o mantenimiento en la actividad de enzimas antioxidantes (POD, SOD y CAT). Sin embargo, estos cambios en la actividad enzimática no mostraron un efecto directo en los parámetros (firmeza y en el porcentaje de peso perdido) como se planteó en la hipótesis de este trabajo.

La actividad antioxidante se mantuvo estable (128-209 o 99-218 μg Trolox/100g P.S, para DPPH y ABTS, respectivamente) durante todo el experimento por 31 días a 6°C, aunque no se encontraron diferencias por efecto de los tratamientos. Del mismo modo, no se observó correlación de los compuestos fenólicos o de la actividad enzimática antioxidante y el mantenimiento de estos valores.

Los resultados de este trabajo mostraron que la aplicación de cera con o sin aceites esenciales puede tener efecto sobre el mantenimiento de la capacidad antioxidante en los frutos. Más estudios futuros se requieren para evaluar si concentraciones más altas de los aceites esenciales utilizados pueden desencadenar una respuesta con un patrón similar al reportado en otros trabajos.

Finalmente, se recomienda considerar la evaluación sensorial de los frutos en trabajos futuros pues, aunque no fue el objetivo de este trabajo, no debe descartarse posibles cambios en el sabor debido al uso de aceites esenciales.

8. Bibliografía

- Arnon, D.I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiol.* 24, 1–15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Baker, J.E., 1976. Superoxide Dismutase in Ripening Fruits. *Plant Physiol.* 58, 644–647. <https://doi.org/10.1104/pp.58.5.644>
- Baysal, T., Demirdöven, A., 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.025>
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., Thompson, A.K., 2014. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Prot.* 64, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.015>
- Bosquez-Molina, E., Guerrero-Legarreta, I., Vernon-Carter, E.J., 2003. Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum–candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Res. Int.* 36, 885–893. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00097-8)
- Bost, J.B., Smith, N.J.H., Crane, J.H., 2013. History, Distribution and Uses, in: *The Avocado: Botany, Production and Uses*. CABI, Wallingford, pp. 10–30.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cheeseman, J.M., 2007. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress* 1, 4–15.
- CONAPA, CONASIPRO, 2016. . CONAPA CONASIPRO. URL <http://www.productoresdeaguacate.com/conapa/web/estadosproductores.php> (accessed 6.8.16).
- Corral-Aguayo, R.D., Yahia, E.M., Carrillo-Lopez, A., González-Aguilar, G., 2008. Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxi-

- dant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10498–10504. <https://doi.org/10.1021/jf801983r>
- Cox, K.A., McGhie, T.K., White, A., Woolf, A.B., 2004. Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.09.008>
- Da Cunha, A., 1987. The estimation of l-phenylalanine ammonia-lyase shows phenylpropanoid biosynthesis to be regulated by l-phenylalanine supply and availability. *Phytochemistry* 26, 2723–2727. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83579-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83579-7)
- Dagostin, S., Schärer, H.-J., Pertot, I., Tamm, L., 2011. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Prot.* 30, 776–788. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.02.031>
- Dann, E.K., Ploetz, R.C., Coates, L.M., Pegg, K.G., 2013. Foliar, fruit and soilborne diseases, in: *The Avocado: Botany, Production and Uses*. CABI, pp. 380–422.
- de Oliveira, A.B., de Almeida Lopes, M.M., Moura, C.F.H., de Siqueira Oliveira, L., de Souza, K.O., Filho, E.G., Urban, L., de Miranda, M.R.A., 2017. Effects of organic vs. conventional farming systems on quality and antioxidant metabolism of passion fruit during maturation. *Sci. Hortic.* 222, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.021>
- Dhall, R.K., 2013. Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 435–450. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568>
- Djami-Tchatchou, A.T., Allie, F., Straker, C.J., 2013. Expression of defence-related genes in avocado fruit (cv. Fuerte) infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *South Afr. J. Bot.* 86, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.02.166>
- DOF, 2006. Productos alimenticios no industrializados para uso humano - Fruta fresca - Aguacate (*Persea americana* Mill) - Especificaciones. [WWW Document]. URL

http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Lists/Instrumentos%20Tcnicos%20Normalizacin%20y%20Marcas%20Colecti/Attachments/67/NMX_AGUACATE.pdf (accessed 11.13.17).

DOF, 1982. Productos alimenticios no industrializados - Fruta fresca - Determinación de tamaño con base al peso unitario. [WWW Document]. URL <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-008-1982.PDF> (accessed 11.13.17).

Donnelly, J.K., McLellan, K.M., Walker, J.L., Robinson, D.S., 1989. Superoxide dismutases in foods. A review. *Food Chem.* 33, 243–270. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(89\)90036-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(89)90036-8)

Engelbrecht, J., Berg, N. van den, 2013. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. *South Afr. J. Sci.* 109, 8 Pages. <https://doi.org/10.1590/sajs.2013/20120058>

FAOSTAT [WWW Document], 2015. . Food Agric. Organ. U. N. URL http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/E (accessed 12.9.15).

Galindo-Tovar, M.E., Arzate-Fernández, A.M., Ogata-Aguilar, N., Landero-Torres, I., 2007. The Avocado (*Persea Americana*, Lauraceae) Crop in Mesoamerica: 10,000 Years of History. *Harv. Pap. Bot.* 12, 325–334. [https://doi.org/10.3100/1043-4534\(2007\)12\[325:TAPALC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3100/1043-4534(2007)12[325:TAPALC]2.0.CO;2)

Granatstein, D., Kirby, E., Ostenson, H., Willer, H., 2015. Global situation for organic tree fruits. *Sci. Hortic.* <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.008>

Grossman, S., Zakut, R., 1979. Determination of the Activity of Lipoxygenase (Lipoxidase), in: Glick, D. (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 303–329. <https://doi.org/10.1002/9780470110454.ch5>

Hodges, D.M. (Ed.), 2003. *Postharvest oxidative stress in horticultural crops*. CRC Press.

Hofman, P.J., Bower, J.P., Woolf, A.B., 2013. Harvesting, Packing, Postharvest Technology, Transport and Processing, in: *The Avocado: Botany, Production and Uses*. CABI, Wallingford, pp. 489–540.

- Hyun, M.W., Yun, Y.H., Kim, J.Y., Kim, S.H., 2011. Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase. *Mycobiology* 39, 257–265. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.4.257>
- Imahori, Y., Takemura, M., Bai, J., 2008. Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.10.017>
- Integrated Taxonomic Information System, 2016. ITIS Standard Report Page: *Persea americana* [WWW Document]. URL http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=18154 (accessed 6.7.16).
- Jaenicke, E.C., Demko, I., 2015. Report to the Organic Trade Association: Preliminary Analysis of USDA's Organic Trade Data: 2011 to 2014. Penn State University.
- Jeong, J., Huber, D.J., Sargent, S.A., 2003. Delay of avocado (*Persea americana*) fruit ripening by 1-methylcyclopropene and wax treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 247–257. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00176-X)
- Jiang, T., Luo, Z., Ying, T., 2015. Fumigation with essential oils improves sensory quality and enhanced antioxidant ability of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Food Chem.* 172, 692–698. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.130>
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Sánchez-Moreno, C., Saura-Calixto, F., 2000. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1686–1690. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000901\)80:11<1686::AID-JSFA694>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1686::AID-JSFA694>3.0.CO;2-Y)
- Karni, L., Prusky, D., Kobiler, I., Bar-Shira, E., Kobiler, D., 1989. Involvement of epicatechin in the regulation of lipoxygenase activity during activation of quiescent *Colletotrichum gloeosporioides* infections of ripening avocado fruits. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35, 367–374. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(89\)90041-6](https://doi.org/10.1016/0885-5765(89)90041-6)

- Kiaune, L., Singhasemanon, N., 2011. Pesticidal Copper (I) Oxide: Environmental Fate and Aquatic Toxicity, in: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, New York, NY, pp. 1–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_1
- Lafuente, M.T., Sala, J.M., Zacarias, L., 2004. Active Oxygen Detoxifying Enzymes and Phenylalanine Ammonia-lyase in the Ethylene-Induced Chilling Tolerance in Citrus Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3606–3611. <https://doi.org/10.1021/jf035185i>
- Lee, H.-J., Yun, Z.-S., 2015. Consumers' perceptions of organic food attributes and cognitive and affective attitudes as determinants of their purchase intentions toward organic food. *Food Qual. Prefer.* 39, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.06.002>
- Ley de Productos Orgánicos [WWW Document], 2006. . D. Of. Fed. URL <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LPO.pdf> (accessed 10.24.16).
- MacLean, D.D., Murr, D.P., DeEll, J.R., Mackay, A.B., Kupferman, E.M., 2007. Inhibition of PAL, CHS, and ERS1 in 'Red d'Anjou' Pear (*Pyrus communis* L.) by 1-MCP. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.007>
- Maftoonazad, N., Ramaswamy, H.S., 2005. Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT - Food Sci. Technol.* 38, 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.007>
- Maftoonazad, N., Ramaswamy, H.S., Moalemiyan, M., Kushalappa, A.C., 2007. Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. *Carbohydr. Polym.* 68, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.020>
- Mditshwa, A., Magwaza, L.S., Tesfay, S.Z., Mbili, N., 2017. Postharvest quality and composition of organically and conventionally produced fruits: A review. *Sci. Hortic.* 216, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.033>
- Mendieta, B., Olaeta, J.A., Pedreschi, R., Undurraga, P., 2016. Reduction of cold damage during cold storage of Hass avocado by a combined use of pre-

- conditioning and waxing. *Sci. Hortic.* 200, 119–124.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.012>
- Nokthai, P., Lee, V.S., Shank, L., 2010. Molecular Modeling of Peroxidase and Polyphenol Oxidase: Substrate Specificity and Active Site Comparison. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 3266–3276. <https://doi.org/10.3390/ijms11093266>
- Olivas, G.I.I., Barbosa-Cánovas, G., 2009. Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables, in: Huber, K.C., Embuscado, M.E. (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer New York, pp. 211–244.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_7
- OMRI, 2017. OMRI Products List [WWW Document]. URL https://www.omri.org/sites/default/files/opl_pdf/CropByCategory-NOP.pdf (accessed 10.16.17).
- Park, H. j., Chinnan, M. s., Shewfelt, R. I., 1994. EDIBLE CORN-ZEIN FILM COATINGS to EXTEND STORAGE LIFE of TOMATOES. *J. Food Process. Preserv.* 18, 317–331. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1994.tb00255.x>
- Park, H.J., Chinnan, M.S., Shewfelt, R.L., 1994. Edible Coating Effects on Storage Life and Quality of Tomatoes. *J. Food Sci.* 59, 568–570.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb05563.x>
- Platt-Aloia, K.A., Thomson, W.W., 1981. Ultrastructure of the mesocarp of mature avocado fruit and changes associated with ripening. *Ann. Bot.* 48, 451–466.
- Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H., Gunawardena, J., 2012. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 565–583. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1185>
- RAE- ASALE, 2016. Diccionario de la lengua española - Edición del Tricentenario [WWW Document]. *Dicc. Leng. Esp.* URL <http://dle.rae.es/?id=1BPOgpt> (accessed 6.11.16).
- Regnier, T., Combrinck, S., Plooy, W. du, Botha, B., 2010. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 57, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.010>

- Reyes A., J.C., Rubí A., M., Aguilar M., J.J., 1995. Manejo organico en el cultivo de aguacate [WWW Document]. URL http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX_1995/Ecol_1_95.pdf (accessed 6.12.16).
- Rivera, S.A., Ferreyra, R., Robledo, P., Selles, G., Arpaia, M.L., Saavedra, J., De-filippi, B.G., 2017. Identification of preharvest factors determining postharvest ripening behaviors in ‘Hass’ avocado under long term storage. *Sci. Hortic.* 216, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.024>
- Rivera-Pastrana, D.M., Gardea, A.A., Yahia, E.M., Martínez-Téllez, M.A., González-Aguilar, G.A., 2013. Effect of UV-C irradiation and low temperature storage on bioactive compounds, antioxidant enzymes and radical scavenging activity of papaya fruit. *J. Food Sci. Technol.* 51, 3821–3829. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0942-x>
- Romero, M.V., Barrett, D.M., 1997. Rapid Methods for Lipoxygenase Assay in Sweet Corn. *J. Food Sci.* 62, 696–700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15438.x>
- Saed-Moucheshi, A., Pakniyat, H., Pirasteh-Anosheh, H., Azooz, M., 2014. Chapter 20 - Role of ROS as Signaling Molecules in Plants, in: Ahmad, P. (Ed.), *Oxidative Damage to Plants*. Academic Press, San Diego, pp. 585–620. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00020-4>
- SAGARPA, 2014. Aumentan exportaciones de aguacate 29 por ciento al primer semestre [WWW Document]. URL <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B615.aspx> (accessed 6.11.16).
- Sala, J.M., Lafuente, M.T., 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00115-0)
- Sanchez-Ballesta, M.T., Zacarias, L., Granell, A., Lafuente, M.T., 2000. Accumulation of Pal Transcript and Pal Activity as Affected by Heat-Conditioning and Low-Temperature Storage and Its Relation to Chilling Sensitivity in Manda-

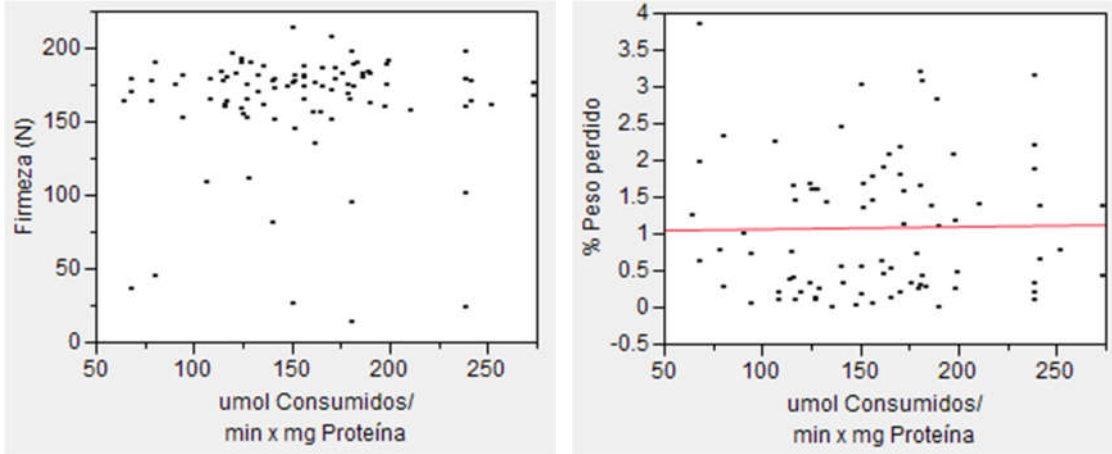
- rin Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2726–2731.
<https://doi.org/10.1021/jf991141r>
- Saucedo-Pompa, S., Rojas-Molina, R., Aguilera-Carbó, A.F., Saenz-Galindo, A., Garza, H. de L., Jasso-Cantú, D., Aguilar, C.N., 2009. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Res. Int., Bioprocesses in Food Industries* 42, 511–515.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.017>
- Sellamuthu, P.S., Mafune, M., Sivakumar, D., Soundy, P., 2013a. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. *J. Sci. Food Agric.* 93, 3024–3031.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6135>
- Sellamuthu, P.S., Sivakumar, D., Soundy, P., Korsten, L., 2013b. Essential oil vapours suppress the development of anthracnose and enhance defence related and antioxidant enzyme activities in avocado fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 81, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.02.007>
- Shabala, S., 2012. *Plant Stress Physiology*. Cabi.
- Sharma, I., Ahmad, P., 2014. Chapter 4 - Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants, in: *Oxidative Damage to Plants*. Academic Press, San Diego, pp. 131–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>
- SIAP, 2016. Cierre anual de producción agrícola en México 2016 [WWW Document]. URL http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/ (accessed 11.13.17).
- Sivakumar, D., Bautista-Baños, S., 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Prot.* 64, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Szollosi, R., 2014. Chapter 3 - Superoxide Dismutase (SOD) and Abiotic Stress Tolerance in Plants: An Overview, in: Ahmad, P. (Ed.), *Oxidative Damage to Plants*. Academic Press, San Diego, pp. 89–129.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00020-4>
- USDA, 2011. Prohibited Pesticides for NOP Residue Testing [WWW Document]. URL <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/NOP-2611-1-ProhibitedPesticidesforNOPResidueTesting.pdf> (accessed 10.15.17).

- USDA Foreign Agricultural Service [WWW Document], 2015. . USDA Foreign Agric. Serv. URL <http://www.fas.usda.gov/data/mexico-avocado-annual-0> (accessed 6.8.16).
- Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., Del Río, M.A., Pérez-Gago, M.B., 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 872–900. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.485705>
- Villa-Rodríguez, J.A., Molina-Corral, F.J., Ayala-Zavala, J.F., Olivas, G.I., González-Aguilar, G.A., 2011. Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of ‘Hass’ avocado. *Food Res. Int.* 44, 1231–1237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012>
- Wang, C.Y., 2010. Alleviation of chilling injury in tropical and subtropical fruits. *Acta Hortic.* 864, 267–273.
- Wang, M., Zheng, Y., Khuong, T., Lovatt, C.J., 2016. Developmental differences in antioxidant compounds and systems in normal and small-phenotype fruit of ‘Hass’ avocado (*Persea americana* Mill.). *Sci. Hortic.* 206, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.04.029>
- Wang, M., Zheng, Y., Khuong, T., Lovatt, C.J., 2012. Effect of harvest date on the nutritional quality and antioxidant capacity in ‘Hass’ avocado during storage. *Food Chem.* 135, 694–698. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.022>
- WHO, 2014. Increasing fruit and vegetable consumption to reduce the risk of non-communicable diseases [WWW Document]. URL http://www.who.int/elena/titles/bbc/fruit_vegetables_ncds/en/ (accessed 6.11.16).
- Wolf, A.B., Laing, W.A., 1996. Avocado Fruit Skin Fluorescence following Hot Water Treatments and Pretreatments. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121, 147–151.
- Yahia, E.M., 2012. Avocado, in: Rees, D., Farrell, G., Orchard, J. (Eds.), *Crop Post-Harvest: Science and Technology*. Wiley-Blackwell, pp. 159–186.
- Yahia, E.M., De Jesus Ornelas-Paz, J., Elansari, A., 2011. 5 - Postharvest technologies to maintain the quality of tropical and subtropical fruits, in: *Posthar-*

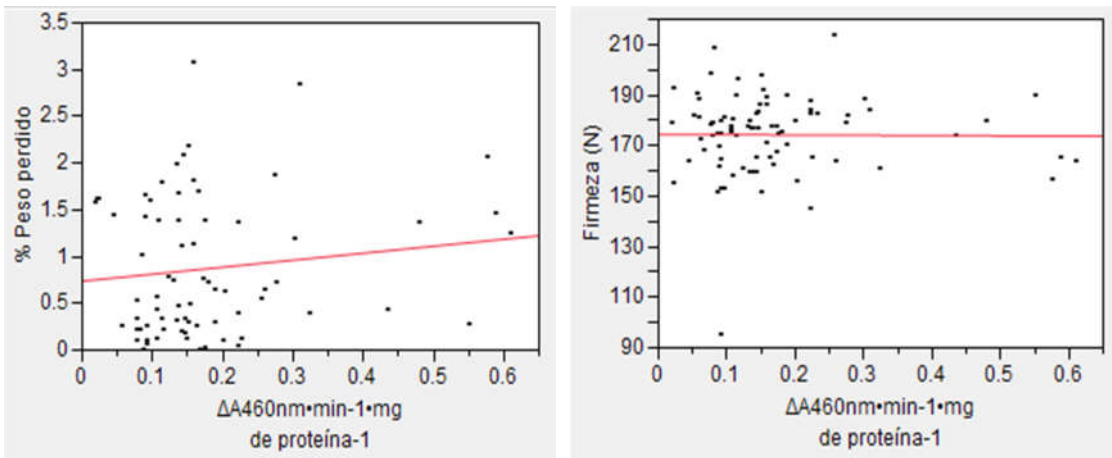
vest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, p. 142–195e.

- Yang, Z., Zhong, X., Fan, Y., Wang, H., Li, J., Huang, X., 2015. Burst of reactive oxygen species in pedicel-mediated fruit abscission after carbohydrate supply was cut off in longan (*Dimocarpus longan*). *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00360>
- Zhang, Z., Huber, D.J., Rao, J., 2013. Antioxidant systems of ripening avocado (*Persea americana* Mill.) fruit following treatment at the preclimacteric stage with aqueous 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 76, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.09.003>
- Zhao, D. y., Shen, L., Fan, B., Liu, K. I., Yu, M. m., Zheng, Y., Ding, Y., Sheng, J. p., 2009. Physiological and Genetic Properties of Tomato Fruits from 2 Cultivars Differing in Chilling Tolerance at Cold Storage. *J. Food Sci.* 74, C348–C352. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01156.x>

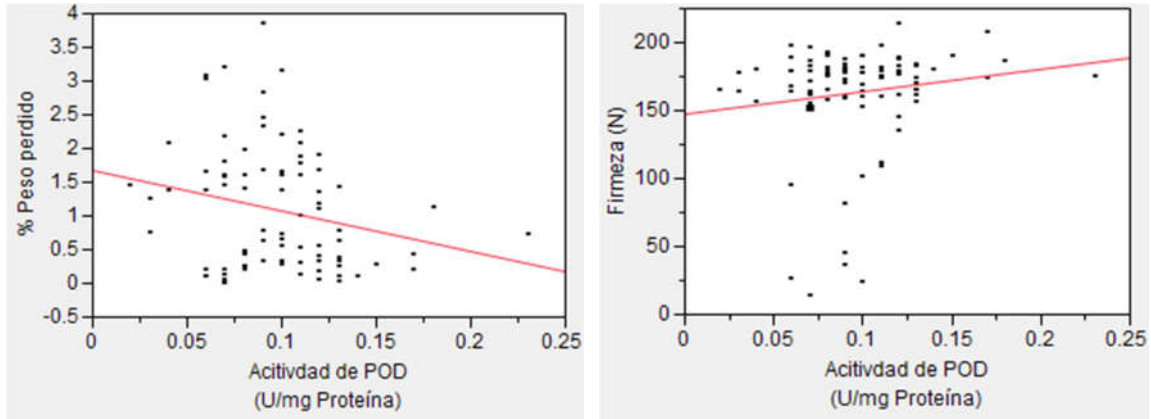
9. ANEXOS



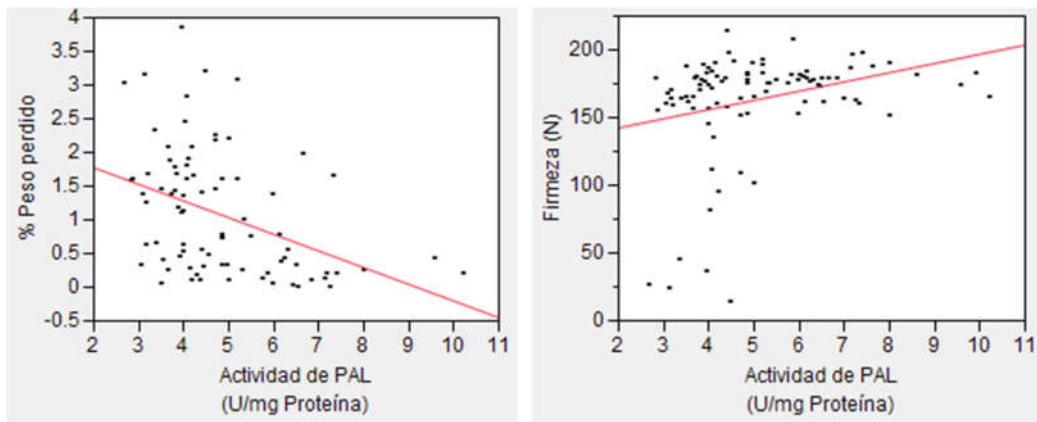
Anexo 1. Correlaciones entre la actividad de Catalasa, el porcentaje de peso perdido y con la firmeza del fruto durante el almacenamiento a 6°C.



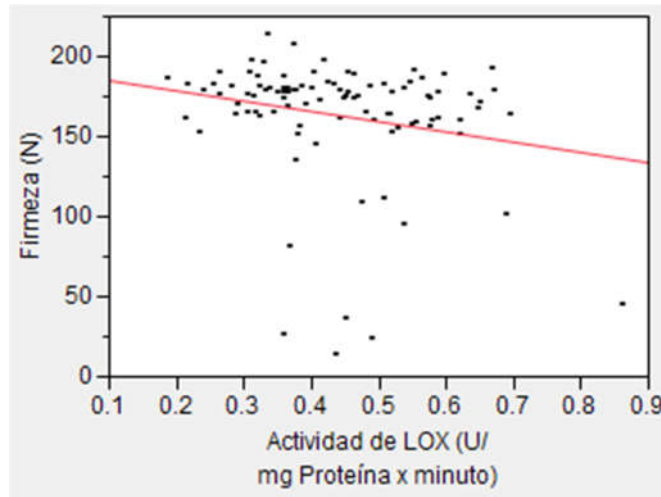
Anexo 2. Correlaciones entre la actividad de peroxidasa, el porcentaje de peso perdido y con la firmeza del fruto durante el almacenamiento a 6°C.



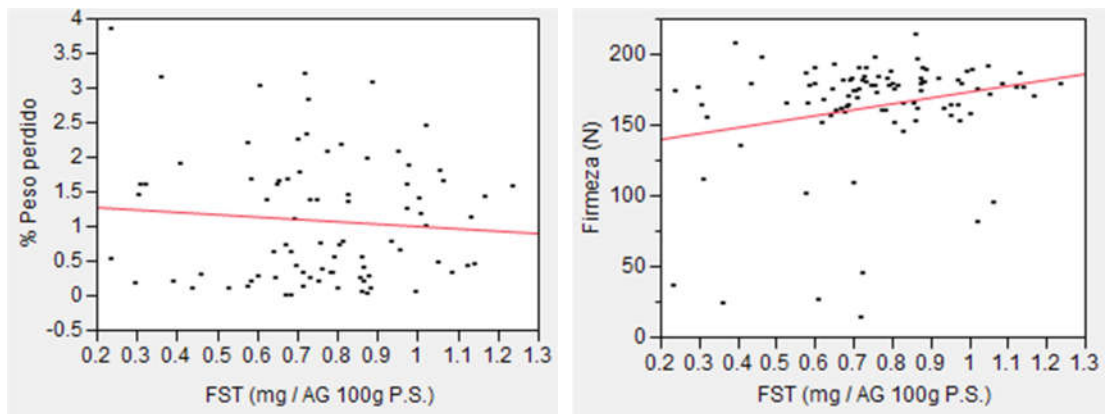
Anexo 3. Correlaciones entre la actividad de superóxido dismutasa, el porcentaje de peso perdido y con la firmeza del fruto durante el almacenamiento a 6°C.



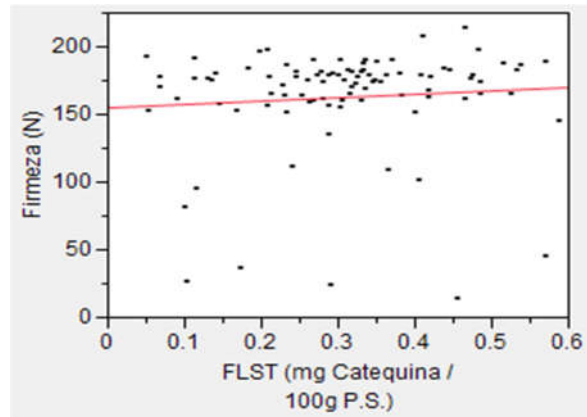
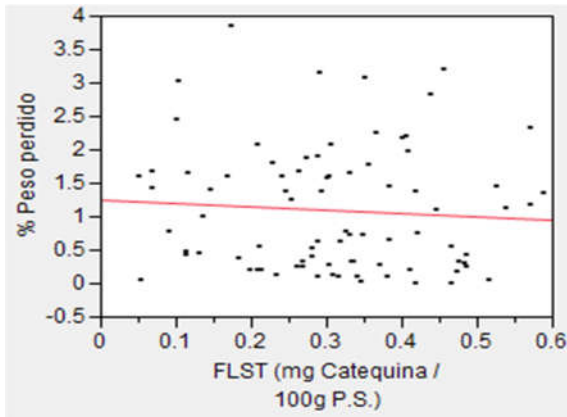
Anexo 4. Correlaciones entre la actividad de Fenilalanina amonio liasa y el porcentaje de peso perdido y con la firmeza del fruto durante el almacenamiento a 6°C.



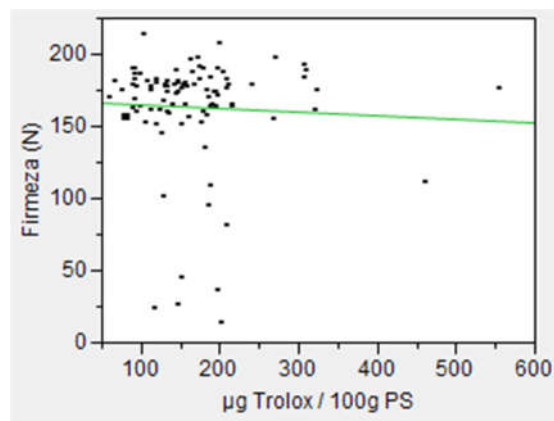
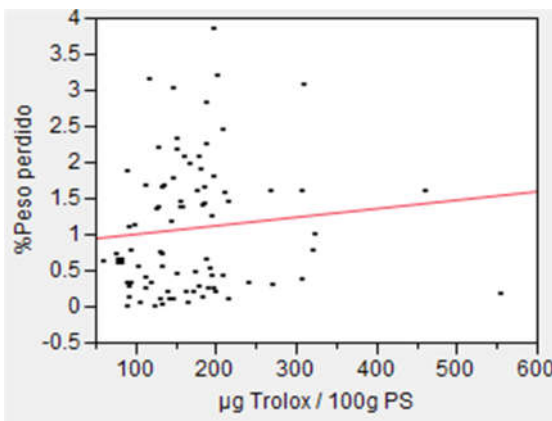
Anexo 5. Correlación entre la actividad de lipoxigenasa y la firmeza del fruto durante el almacenamiento a 6°C.



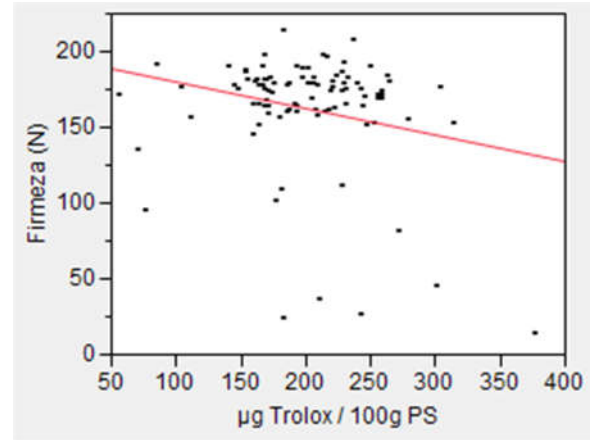
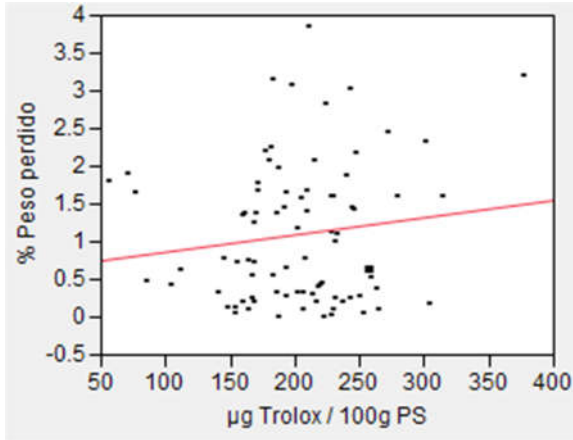
Anexo 6. Correlación entre el contenido de fenoles solubles totales, peso perdido y firmeza durante el almacenamiento a 6°C



Anexo 7. Correlación entre el contenido de flavonoides solubles totales, el porcentaje de pérdida de peso y la firmeza.



Anexo 8. Correlación entre la actividad antioxidante medida por DPPH solubles totales, el porcentaje de pérdida de peso y la firmeza.



Anexo 9. Correlación entre la actividad antioxidante medida por DPPH solubles totales, el porcentaje de pérdida de peso y la firmeza.