



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Efecto de atmósferas controladas y ricas en especies reactivas de oxígeno en las características químicas y bioquímicas y calidad poscosecha de frutos de zarzamora (*Rubus sp.*)”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

IAG. Juan Pablo Ledesma Valladolid

Dirigido por:

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva

Querétaro, Qro. a 28 de noviembre del 2019



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

“Efecto de atmósferas controladas y ricas en especies reactivas de oxígeno en las características químicas y bioquímicas y calidad poscosecha de frutos de zarzamora (*Rubus sp.*)”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

IAG. Juan Pablo Ledesma Valladolid

Dirigido por:

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Presidente

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Secretario

Dra. Dulce María Rivera Pastrana
Vocal

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios
Suplente

Dr. Miguel David Dufoo Hurtado
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre del 2019
México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva, por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas y por todo el apoyo y asesoramiento brindado para la culminación de este proyecto de investigación.

De igual manera, agradezco a los miembros de este comité; Dr. Miguel David Dufoo Hurtado, Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios, Dra. Dulce María Rivera Pastrana y al Dr. Gerardo Manuel Nava Morales, por formar parte de este comité evaluador.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de Maestría otorgada y las facilidades para la realización y culminación del presente proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos Adriana Ibarra, Eduardo Rodríguez y Martín Galicia, por su amistad dentro y fuera del laboratorio.

A Angélica Tello, Karla, Sandy y Keila, por su amistad.

DEDICATORIA

Para mi familia;

Para mis padres, Marcela Valladolid Pérez y Jorge Ledesma Ángeles, por todo su apoyo y compañía incondicional, los cuales me impulsan a lograr todos mis objetivos profesionales y personales.

Para mis hermanos, Wendy, José María y Jorge, por todo su apoyo y compañía.

Para Andrea Sánchez, por todo tu cariño, apoyo, y compañía.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. INTRODUCCIÓN	18
2. ANTECEDENTES.....	20
2.1. Generalidades de la zarzamora.....	20
2.2. Producción mundial de berries.....	20
2.3. Producción nacional de berries.....	22
2.4. Origen del cultivo de Zarzamora.....	25
2.5. Descripción botánica de la Zarzamora.....	25
2.5.1. Clasificación taxonómica.....	25
2.6. Estados fenológicos del fruto de zarzamora.	26
2.7. Composición química de la zarzamora.	27
2.7.1. Contenido de carbohidratos.	27
2.7.2. Contenido de vitaminas y minerales.	28
2.7.3. Ácidos orgánicos.....	31
2.7.4. Factores bioquímicos del deterioro: Enzimas.	31
2.8. Composición fitoquímica de la zarzamora.	32
2.8.1. Compuestos fenólicos y sus derivados.....	33
2.8.2. Antocianinas.	35

2.9. Manejo poscosecha de las zarzamoras.....	40
2.9.1. Requerimientos de enfriado poscosecha.....	40
2.9.2. Almacenamiento en atmósferas controladas.....	41
2.10. Especies reactivas de oxígeno (ERO`s)	43
2.10.3. El estrés medio ambiental y la producción de especies reactivas de oxígeno.	47
2.10.6. Mecanismos de regulación de especies reactivas de oxígeno (ERO`s) en células vegetales.....	49
2.11. Uso de las ERO`S como factor poscosecha para mejorar la vida de anaquel	50
3. JUSTIFICACIÓN.....	54
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
4.1. Hipótesis	55
4.2. Objetivo general.....	55
4.3. Objetivos específicos.....	55
5. METODOLOGÍA	56
5.1. Material biológico.....	56
5.2. Estrategia experimental.....	58
5.2.1. Efecto de los tratamientos de atmósferas con ERO's sobre la calidad y perfil químico y bioquímico de frutos de zarzamora almacenados a 1 y 10 °C.....	58
5.2.2. Efecto de los tratamientos de atmósferas controladas sobre la calidad y perfil químico y bioquímico de frutos de zarzamora almacenados a 1 y 10 °C.....	59
5.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	61
5.3.1. Atmósferas con ERO's.....	61
5.3.2. Atmósferas controladas.....	62

5.4 Métodos utilizados	63
5.4.1. Parámetros químicos; Acidez total, sólidos solubles totales (°Brix) y pH.....	63
5.4.2 Pérdida de peso.....	63
5.4.3. Firmeza.....	64
5.4.4. Color objetivo.....	64
5.4.5. Extracción de compuestos fenólicos.....	65
5.4.6. Antocianinas monoméricas.....	65
5.4.7. Antocianinas poliméricas	67
5.4.7 Fenoles totales.....	69
5.4.8 Flavonoides totales.....	70
5.9. Capacidad antioxidante ABTS.....	71
5.11. Determinación de actividad de enzimas del sistema antioxidante.....	74
5.11.1. Preparación de polvos de acetona.....	74
5.11.2. Preparación del extracto enzimático crudo.....	74
5.11.3. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD).....	75
5.11.4. Actividad enzimática de catalasa (CAT).....	75
5.12. Determinación de actividad de enzimas de degradación de la pared celular.	75
5.12.1. Preparación del extracto crudo enzimático.....	75
5.12.2. Actividad de poligalacturonasa.....	76
5.12.3. Actividad de celulasa.....	76
5.12.4. Actividad de pectinmetilesterasa.....	76
5.12.5 Determinación del contenido de proteína total.....	77
5.13. Análisis del perfil de antocianinas por HPLC-DAD.....	77

6.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	79
6.1. Efecto de las atmósferas controladas en los parámetros evaluados a 1 y a 10 °C.....	79
6.1.1. Efecto de los tratamientos de atmósferas controladas sobre la calidad y vida de anaquel de los frutos; sólidos Solubles Totales y Acidez Total.....	79
6.1.2. Efecto de las atmósferas controladas en la pérdida de peso.....	87
6.1.3. Efecto de las atmósferas controladas en la tasa de respiración.	93
6.1.4. Efecto de las atmósferas controladas en la firmeza y enzimas de la degradación de la pared celular: poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y celulasa.	96
6.1.5. Efecto de las atmósferas controladas en el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas y en el color.	105
6.1.6. Efecto de las atmósferas controladas en el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.....	119
6.1.7. Efecto de las atmósferas controladas sobre la capacidad antioxidante por el método ABTS.....	123
6.2. Efecto de atmósferas con especies reactivas de oxígeno en la calidad poscosecha de frutos almacenados a 1 y 10 °C.	127
6.2.2. Efecto de las atmósferas con ERO´s en la pérdida de peso.....	129
6.2.3. Efecto de las atmósferas con ERO´s en la tasa de respiración.	130
6.2.4. Efecto de las atmósferas con ERO´s en la firmeza y actividades de enzimas de la degradación de la pared celular: poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y celulasa.....	131
6.2.5. Efecto de las atmósferas con ERO´s en el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas y el color (L, a*, b* y ΔE).....	132

6.2.6. Efecto de las atmósferas con ERO's en el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.....	137
6.2.8. Efecto de las atmósferas con ERO's sobre la actividad específica de superóxido dismutasa.....	142
7. CONCLUSIONES	144
8. REFERENCIAS	145

Dirección General de Bibliotecas UAG

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución nacional de la producción de zarzamora.	24
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la zarzamora.....	26
Tabla 3. Contenido de carbohidratos y composición proximal de la zarzamora.	29
Tabla 4. Contenido de vitaminas en frutos de zarzamora.	30
Tabla 5. Contenido de minerales de la zarzamora.	30
Tabla 6. Principales ácidos hidroxibenzoicos.	34
Tabla 7. Principales ácidos hidroxicinámicos.	34
Tabla 8. Grupos funcionales en diferentes carbonos de la estructura de las antocianidinas.	36
Tabla 9. Gradiente utilizado para la separación de antocianinas en una columna C18 fase reversa.....	78
Tabla 10. Comparación de medias de de SST, AT y pH en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas controladas AC1 y AC2: (15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂) por 3 y 7 días y frutos control en aire y almacenados a 1 y 10 °C por 21 y 15 días, respectivamente.	83
Tabla 11. Porcentaje de pérdida de peso de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....	89
Tabla 12. Disminución de la tasa de respiración de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de AC por 3 y 7 días y su posterior almacenamiento durante 21 días a 1 y 10 °C.	94
Tabla 13. Comparación de medias de los valores de firmeza y actividad enzimática de la pared celular en frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y	

AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....102

Tabla 14. Comparación de media del cianidina-3-O-glucósido (mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂.....107

Tabla 15. Comparación de medias del contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....115

Tabla 16. Comparación de medias del contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas en frutos de zarzamora sometidos a AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....115

Tabla 17. Comparación de medias del contenido de fenoles totales y flavonoides totales en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....122

Tabla 18. Comparación de medias de la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....125

Tabla 19. Comparación de medias de la actividad de superóxido dismutasa en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....126

Tabla 20. Comparación de medias del contenido de SST, AT y pH de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....128

Tabla 21. Porcentaje de pérdida de peso de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con especies reactivas de oxígeno (0.07 ppm peróxido de hidrógeno) por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....	130
Tabla 22. Cambios en la tasa de respiración en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....	131
Tabla 23. Comparación de medias de la firmeza y metabolismo de la pared celular en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.	132
Tabla 24. Comparación de medias del contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente. ...	136
Tabla 25. Comparación de medias de los valores de color de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.....	137
Tabla 26. Comparación de medias del contenido de fenoles totales y flavonoides totales en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.	139
Tabla 27. Comparación de medias de la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.	141
Tabla 28. Comparación de medias de la actividad de superóxido dismutasa de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de berries (FIRA, 2016).	21
Figura 2. Producción nacional de zarzamora. En miles de toneladas (SIAP, 2018).	23
Figura 3. a. Estados fenológicos en el desarrollo del fruto de zarzamora. A) Brotes en etapa de dormancia, B) generación de los brotes, C) generación del capullo de la flor, D) apertura media de la flor, E) apertura completa de la flor, F) fruto inmaduro completo. b. Estructura típica del fruto de zarzamora.....	27
Figura 4. Estructura del ácido hidroxibenzoico (a). Estructura del ácido hidroxicinámico (b).....	34
Figura 5. Estructura básica de las antocianidinas.....	35
Figura 6. Estructura química de una antocianina sustituida con un azúcar y esterificada con un ácido cinámico.....	37
Figura 7. Cambios estructurales de las antocianinas a diferentes valores de pH en el medio.	39
Figura 8. Generación e interconversión de especies reactivas de oxígeno derivadas de O ₂	45
Figura 9. Fuentes y sitio de generación celular de especies reactivas de oxígeno.	47
Figura 10. Estrategia experimental para atmósferas con especies reactivas de oxígeno.....	58
Figura 11. Estrategia experimental para atmósferas controladas.	60
Figura 12. Espectro de absorción de las antocianinas (a); y transformaciones estructurales bajo diferentes valores de pH (b) (Giusti y Wrolstad, 2001).	66
Figura 13. Blanqueamiento de antocianinas por metabisulfito de sodio (Giusti y Wrolstad, 2001).....	68

Figura 14. Reacción de ácido fenólico con reactivo de Folin.	70
Figura 15. Formación del complejo flavonoide.....	71
Figura 16. Oxidación del radical ABTS.	72
Figura 17. Reducción del radical DPPH.....	73
Figura 18. Cambios de los sólidos solubles totales en frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas: control en aire, AC1 y AC2: (15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂) por 3 y 7 días, almacenados 21 días a 1 °C.	81
Figura 19. Cambios en el pH de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas controladas: AC1 y AC2: (15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂) por 3 y 7 días por 15 días de almacenamiento a 10 °C.....	82
Figura 20. Cambios en el porcentaje de acidez total en frutos de zarzamora almacenados en atmósferas controladas: AC1 y AC2: (15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂) por 3 y 7 días durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.	82
Figura 21. Metabolismo fermentativo bajo condiciones de baja concentración de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono.....	87
Figura 22. Porcentaje de pérdida de peso de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.....	89
Figura 23. Cambios en la tasa de respiración (mL CO ₂ /Kg*Hr) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 15 días de almacenamiento a 1 °C.....	94
Figura 24. Cambios en la firmeza (N) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.....	100

Figura 25. Cambios en la actividad específica de celulasa (mg glucosa/g Proteína) en frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.....	101
Figura 26. Cambios en la actividad específica de poligalacturonasa (mg ác. galacturónico/g Proteína) en frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C..	101
Figura 27. Cromatograma HPLC-DAD a 520 nm del extracto fenólico de Zarzamora tratamiento Control día 0. Picos: 2 y 3-desconocidos; Pico 1: cianidina -3-O-glucósido.....	107
Figura 28. Cambios en las antocianinas monoméricas (mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC's durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 15 días de almacenamiento a 10 °C.	112
Figura 29. Cambios en el contenido de antocianinas poliméricas en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 15 días de almacenamiento a 10 °C.....	112
Figura 30. Cambios en el valor de luminosidad "L" de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C...	113
Figura 31. Cambios en el valor de color "a*" de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.	113
Figura 32. Cambios en el valor de color "b*" de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.	114

Figura 33. Cambios en la diferencia de color ΔE de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.	114
Figura 34. Esquema de las ramificaciones de las rutas de biosíntesis de polifenoles.	118
Figura 35. Cambios en el contenido de fenoles totales (mg EAG/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 10 °C.	121
Figura 36. Cambios en el contenido de flavonoides totales (mg ECAT/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 10 °C.	122
Figura 37. Cambios en la capacidad antioxidante por el método ABTS de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO ₂ + 10%O ₂ y AC2: 15%CO ₂ + 5%O ₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C. ..	125
Figura 38. Cambios en los SST de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, seguidas por 10 días de almacenamiento a 10 °C.	128
Figura 39. Cambios en el porcentaje de pérdida de peso de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.	130
Figura 40. Cambios en el contenido de antocianinas monoméricas (mg cianidina-3-O-glucósido) de frutos de zarzamora sometidos a tratamientos con atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.	135

Figura 41. Cambios en el porcentaje de antocianinas poliméricas en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO´s por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 10 días de almacenamiento a 10 °C	135
Figura 42. Cambios en el valor de color "a*" de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO´s por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 10 días de almacenamiento a 10 °C.	136
Figura 43. Cambios en el contenido de fenoles totales (mg EAG/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO´s por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C	138
Figura 44. Cambios en el contenido de flavonoides totales (mg ECAT/100 g PF) en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO´s por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C	139
Figura 45. Cambios en la capacidad antioxidante por el método ABTS de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO´s por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.	141

RESUMEN

El cultivo de zarzamora es de gran importancia económica a nivel nacional, su producción en 2017, alcanzó 270,000 toneladas con un valor de 321 millones de dólares. En el mismo año la producción y su valor crecieron 110 y 158 % respectivamente respecto al año 2013, gracias a la posición de México frente al principal mercado de esta fruta, los Estados Unidos. Sin embargo, los frutos son altamente susceptibles a un rápido y progresivo deterioro que lleva a una disminución de la vida poscosecha durante su almacenamiento y comercialización. Es posible que la aplicación de atmósferas controladas y atmósferas enriquecidas con especies reactivas de oxígeno induzcan respuestas metabólicas que ayudan a preservar las características de calidad así como aumentar la vida de anaquel de frutos de zarzamora. El objetivo del presente proyecto fue evaluar el efecto de atmósferas ricas en especies reactivas de oxígeno (0.07 ppm H₂O₂ durante 12 y 24 horas) y atmósferas controladas con altas concentraciones de dióxido de carbono (AC1: 15%CO₂+10%O₂, AC2: 15%CO₂+5%O₂, por 3 y 7 días) sobre las respuestas químicas y bioquímicas de frutos de zarzamora durante 21 días almacenamiento poscosecha. Los resultados muestran un efecto positivo del factor tiempo de exposición a las atmósferas controladas logrando disminuir el metabolismo celular, logrando disminuir el contenido de sólidos solubles totales en frutos sometidos durante 3 y 7 días respecto al tratamiento control (10.20, 10.30 y 11.60, respectivamente), la pérdida de peso (4.85, 6.29 y 7.13%, respectivamente), la tasa de respiración (6.48, 5.49 y 7.99 mL CO₂/kg*h, respectivamente) así como en la preservación de la firmeza (7.72, 7.12 y 5.65 N, respectivamente) gracias a la inhibición de la actividad de enzimas del metabolismo de la pared celular. De igual manera se preservaron las características colorimétricas disminuyendo significativamente el cambio de color (1.27, 1.45 y 2.54, respectivamente). No se observó un efecto estadísticamente significativo de la aplicación de atmósferas con especies reactivas de oxígeno sobre las variables de respuesta evaluadas.

Palabras clave: atmósferas controladas, especies reactivas de oxígeno, vida poscosecha, calidad poscosecha.

ABSTRACT

The blackberry crop has a great economic importance in national level, its production reached up to 270,399 tons in 2017 with a value up to 321 million dollars. In the same year, the blackberry production and economic value grew up 110 and 158% respectively compared to 2013, and this was thanks of Mexico geographic position near to United States of America which is the greatest blackberries consumer. However, these fruits are highly susceptible to a quick and progressive deterioration that causes a shelf life postharvest decrement. It is possible that the metabolic changes induced by the postharvest treatments could trigger several metabolic responses that help to preserve the quality characteristics and prolong the shelf life postharvest. The aim of this investigation was to evaluate the controlled atmospheres effect (CA1: 15%CO₂+10%O₂, CA2: 15%CO₂+5%O₂, during 3 and 7 days) and evaluate the reactive oxygen species atmospheres effect (0.07 ppm H₂O₂ during 12 and 24 hours) on chemistry and biochemistry responses in blackberry fruits along 21 days of postharvest storage. The results showed a controlled atmospheres positive effect reducing the cellular metabolism significantly. The total solids soluble were reduced in fruits subjected to 3 and 7 days to controlled atmospheres treatments compared to control treatment (10.20, 10.30, and 11.60, respectively). The weight loss percentage (4.85, 6.29, and 7.13%; 3 and 7 days to controlled atmospheres treatments and control treatment, respectively) and the respiration rate (6.48, 5.49 y 7.99 mL CO₂/kg*h; 3 and 7 days to controlled atmospheres treatments and control treatment, respectively) were reduced as well as the firmness fruit was preserved in fruits subjected to controlled atmospheres treatment (3 and 7 days) compared to control fruits (7.72, 7.12, and 5.65 N, respectively) due to a cell wall degradation enzymes activity inhibitory effect. The colorimetric characteristics were preserved reducing the total change color (Delta E)

(1.27, 1.45, and 2.54, respectively. There no was a significant effect of reactive oxygen species atmospheres on the response variables evaluated.

Keywords: controlled atmospheres, oxygen reactive species, shelf life postharvest, and postharvest quality.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. INTRODUCCIÓN

La alta aceptabilidad del consumidor por los frutos de zarzamoras las ha posicionado como un producto de gran importancia económica a nivel nacional. Datos oficiales muestran un gran incremento, tanto en la superficie sembrada como en la producción de zarzamora, registrando en el año 2017, a una producción total de 270,399 mil toneladas de frutillas, que representó un incremento de más del doble respecto de la producción registrada en el año 2013. El valor de la producción generó un ingreso económico de más de 321 millones de dólares en el año 2017 y este fue 1.6 veces mayor que el registrado en el año 2013. El incremento en el consumo de frutillas se debe principalmente a su alto valor nutritivo, lo que conlleva a un gran aporte de compuestos antioxidantes, como las antocianinas, las cuales ejercen un efecto altamente positivo en la salud de los consumidores. No obstante, este fruto tiene una alta actividad metabólica que lo hace altamente perecedero, y por tanto presenta una vida de anaquel de solo 12 a 14 días a 1 °C. Las características de calidad más afectadas y que determinan su vida de anaquel son la pérdida de frescura, marchitez y el desarrollo de pudriciones. De igual manera las frutillas se ven afectadas por la inestabilidad de los diversos compuestos fenólicos presentes en las mismas, principalmente las antocianinas, las cuales, debido a su inestabilidad, su estructura cambia provocando un fenómeno denominado “reversión de color de las antocianinas”, lo que conlleva a un cambio de color de las frutillas maduras, pasando de colores negros a coloraciones rojizas propias de un producto inmaduro. Como consecuencia la comercialización de las frutillas se ve afectada, provocando importantes pérdidas económicas.

Pocas son las investigaciones realizadas para zarzamora y las existentes no proporcionan datos favorables ni concisos de la implementación de atmósferas controladas en la conservación de frutos de zarzamora. Tal es la investigación realizada por Brackman et al., (2016) que a través de la aplicación de atmósferas con altas concentraciones de dióxido de carbono logró reducir la pérdida de peso

pero no logró mantener las características colorimétricas deseadas en los frutos de zarzamora.

Por todo lo anterior, el presente trabajo de tesis de maestría, se enfocó a evaluar el efecto de las aplicaciones de atmósferas ricas en especies reactivas de oxígeno y atmósferas controladas sobre las características químicas, bioquímicas, la calidad y vida de anaquel de frutos de zarzamora cv 'Tupy' procedentes del Estado de Michoacán.

Dirección General de Bibliotecas UAO

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la zarzamora

El grupo de las zarzas, se refiere a un grupo diverso de plantas pertenecientes al género *Rubus*, las cuales a su vez pertenecen a la familia rosaceae. Las zarzadoras silvestres tienen la capacidad para crecer en los cinco continentes como arbustos de lento crecimiento tanto en bosques templados como en tierras tropicales. Algunas especies de zarzadoras tienen la capacidad para crecer en climas fríos y en altas altitudes, mientras que otras tienen la capacidad para crecer en terrenos fangosos (Bushway et al., 2008).

Aunque se han descrito muchas especies de zarzamora; solamente alrededor de dos a tres docenas, son comercialmente importantes (Bushway et al., 2008).

2.2. Producción mundial de berries.

La evolución del mercado mundial de las berries muestra un incremento en la producción y en el comercio internacional de magnitud considerable. Uno de los factores que ha impulsado este mercado es la demanda mundial y los precios atractivos para los productores, que hacen rentable la inversión en tecnología y mejoras en la calidad (FIRA, 2016).

Entre los años 2004 y 2013, la producción mundial de berries presentó un crecimiento promedio anual de 3.3 por ciento. En 2013, dicha producción se situó en 11.2 millones de toneladas, lo que representó un aumento de 5.3 por ciento anual con respecto al 2012. (Figura 1) (FIRA, 2016).

En 2013, los principales países productores de berries en el mundo fueron: China (27.3 por ciento), Estados Unidos (19.0 por ciento), Rusia (6.8 por ciento), Polonia (5.4 por ciento) y México (4.9 por ciento) (FIRA, 2016).

En conjunto estos países participaron con 63.5 por ciento de la producción mundial. Entre 2004 y 2013, los principales productores presentaron tasas anuales promedio de producción positivas, con excepción de Rusia, que tuvo un clima adverso para el cultivo de las berries (FIRA, 2016).

En ese mismo periodo, la producción de berries en México creció a una tasa promedio de 11.4 % y se ubicó por arriba de los datos de crecimiento de los otros países; China lo hizo a 5.4 %; Estados Unidos a 3.9 % y Polonia a 2.7 % (FIRA, 2016)

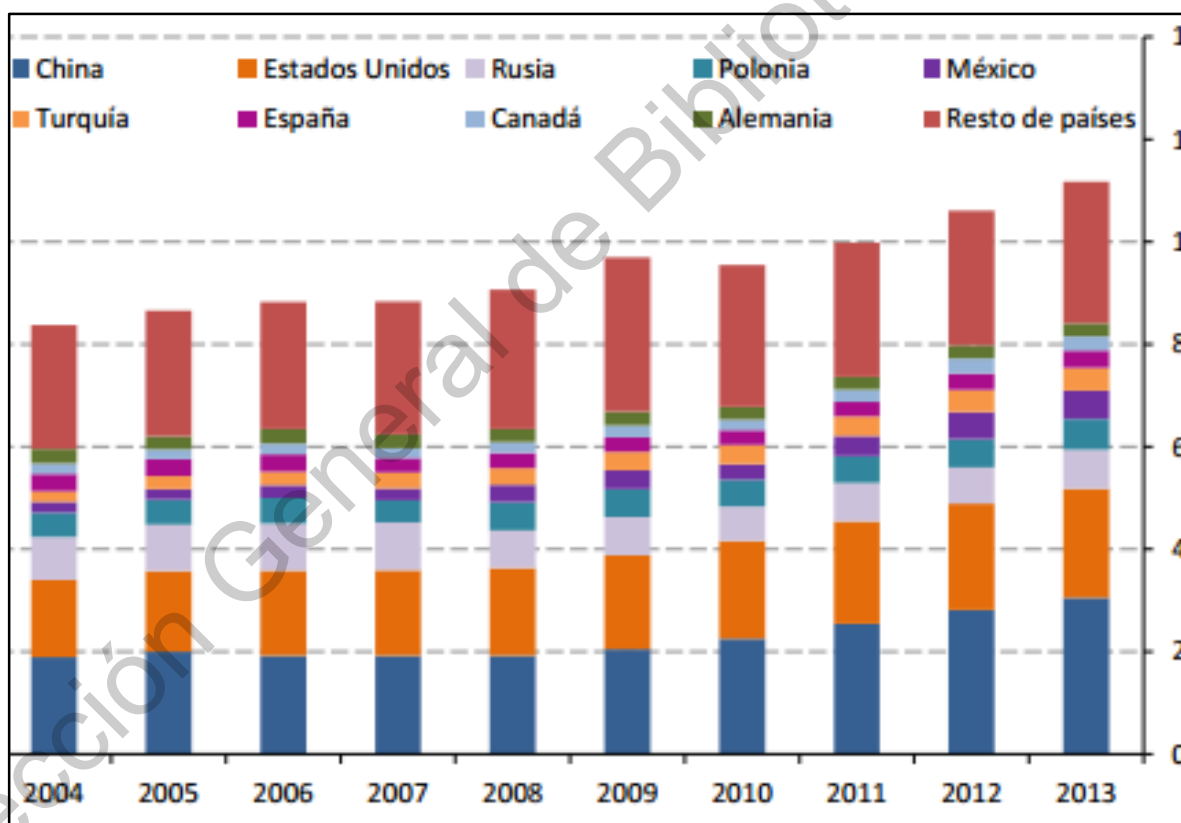


Figura 1. Producción mundial de berries (FIRA, 2016).

2.3. Producción nacional de berries.

En México, la producción de berries ha aumentado notablemente durante los últimos años. En 2003 se cosecharon 3,750 hectáreas de berries en todo el país y para el 2017, la superficie cosechada aumentó a 36,136.33 hectáreas (FIRA, 2016).

Desde el punto de vista del valor de producción de las berries, en el 2003 representó 0.9 por ciento del valor total de la producción agrícola de México, mientras que en 2014 este porcentaje fue de 3.1 por ciento. En las exportaciones sucede algo similar; en 2003 la participación de las exportaciones de berries en el valor total de las exportaciones agrícolas de México fue de 3 por ciento, mientras que en 2015, fue de 11.7 por ciento (FIRA, 2016).

Durante 2003, se produjeron 176,197 toneladas de berries y, para 2017, la producción llegó a 1,085,719.2 toneladas, que representó un aumento de una tasa promedio anual de 12.8 por ciento en esos años. Respecto a la producción por variedad, en 2003 la principal frutilla producida en el país fue la fresa, con 146 mil toneladas (82.9 por ciento de la producción de berries). Le siguió la producción de zarzamora, con 28 mil toneladas o 15.7 por ciento de la producción de berries; la frambuesa y los arándanos, con valores alrededor de 2 mil 300 toneladas, respectivamente. En 2017, la fresa se mantuvo como la principal frutilla, aunque disminuyó su participación a 60.64 % de la producción total; le seguida de la zarzamora, con 24.90%; la frambuesa, con 11.06% y el arándano, con 3.38%. Estos datos muestran que las berries diferentes a la fresa, han ganado mayor participación en el mercado y por tanto en la producción nacional (FIRA, 2016).

La producción nacional de zarzamora alcanzó las 270,399.37 toneladas, (SIAP, 2018), representando el 24.90% de la producción total de berries (1,085,719.2 toneladas).(Figura 2). Para el 2017, se calculó que el consumo per cápita anual de zarzamora fue de 1.6 Kg.

La distribución en la producción nacional es bastante dispar, Michoacán es el principal productor con 238, 832 toneladas (97.7%), y un valor económico de 9051 51 millones de pesos de los 9 mil 265 millones de pesos del ingreso económico total (Tabla 1).

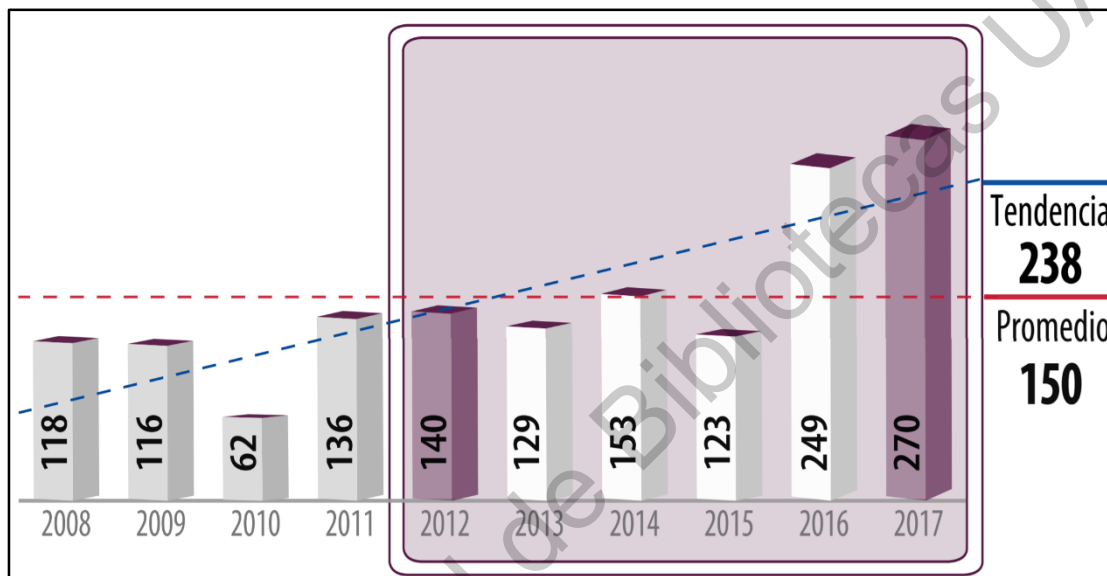


Figura 2. Producción nacional de zarzamora. En miles de toneladas (SIAP, 2018).

Tabla 1. Distribución nacional de la producción de zarzamora.

Entidad federativa	Volumen (toneladas)
Total nacional	270,399.37
Michoacán	260,143.25
Jalisco	7565.79
Colima	1669.80
Baja California	721.52
México	123.40
Guanajuato	59
Morelos	36
Querétaro	33
Veracruz	17
Cd. México	16
Resto	16

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.4. Origen del cultivo de Zorzamora

Se estima que el cultivo de la zorzamora se remonta desde su recolección en estado silvestre desde hace más de dos mil años, incluso desde tiempos de los griegos, fecha de la cual se tienen indicios de su recolección.

Las zorzamoras eran recolectadas desde los setos silvestres en Europa, y eran utilizadas para propósitos medicinales y culinarios hasta el siglo XVI. No fue hasta el siglo XVII que el cultivo de la zorzamora fue domesticado, y en el siglo XIX ya se habían generado una considerable cantidad de variedades de zorzamora y se había iniciado su comercialización (Bushway et al., 2008).

El cultivo de las zorzamoras en América inició entre los años de 1850 y 1860. Para el año de 1867, cerca de 19 variedades de zorzamora ya se habían domesticado completamente, de las cuales su desarrollo se basó en la selección de semillas locales, propias de cada región (Bushway et al., 2008)

Para el final del siglo XIX, en los Estados Unidos de América se había desarrollado un número considerable de variedades comercialmente viables, y su superficie sembrada llegó a alcanzar los 400 acres en el año 1948, ubicados principalmente en el sureste de los Estados Unidos (Bushway et al., 2008)

Al día de hoy, en las regiones próximas a las costas del Pacífico, Estados Unidos y México son las zonas más importantes de producción de zorzamora, donde se han desarrollado variedades de alto rendimiento, de mejor tamaño y más resistentes a diversos desordenes fisiológicos (Bushway et al., 2008)

2.5. Descripción botánica de la Zorzamora

2.5.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo con Ávila Fonseca, (2011), la clasificación taxonómica de la zorzamora es la siguiente (Tabla 2):

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la zarzamora.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>ERO`sales</i>
Familia	<i>ERO`saceae</i>
Género	<i>Rubus sp</i>
Nombre Científico	<i>Rubus fruticosus;</i>
Nombre Común	Zarzamora, mora, mora de castilla

2.6. Estados fenológicos del fruto de zarzamora.

En el desarrollo de los frutos de la zarzamora, uno de los factores determinantes para su óptimo desarrollo es la acumulación de horas de frío, las cuales dependiendo del tipo de cultivar pueden llegar a alcanzar hasta 111 horas frío (≤ 7.2 °C), de igual manera, dependiendo de la región en donde se encuentre el cultivo.

De acuerdo con Hussain et al., (2016), el desarrollo del fruto de zarzamora se puede dividir en los siguientes estados fenológicos: brotes en etapa de dormancia, generación de los brotes, generación del capullo de la flor, apertura media de la flor, apertura completa de la flor, fruto inmaduro completamente verde, maduración temprana del fruto y fruto completamente maduro.

El tiempo que comprenden estos estados fenológicos alcanza en promedio 111 días, que varía con el cultivar y las condiciones ambientales. Los estados fenológicos del fruto de la zarzamora se esquematizan en la Figura 3a.

Alrededor de 75-125 drupelas componen el total del fruto de zarzamora (Figura 3b). Los frutos individuales generalmente pesan de 3-12 g, dependiendo de la variedad (Bushway et al., 2008).

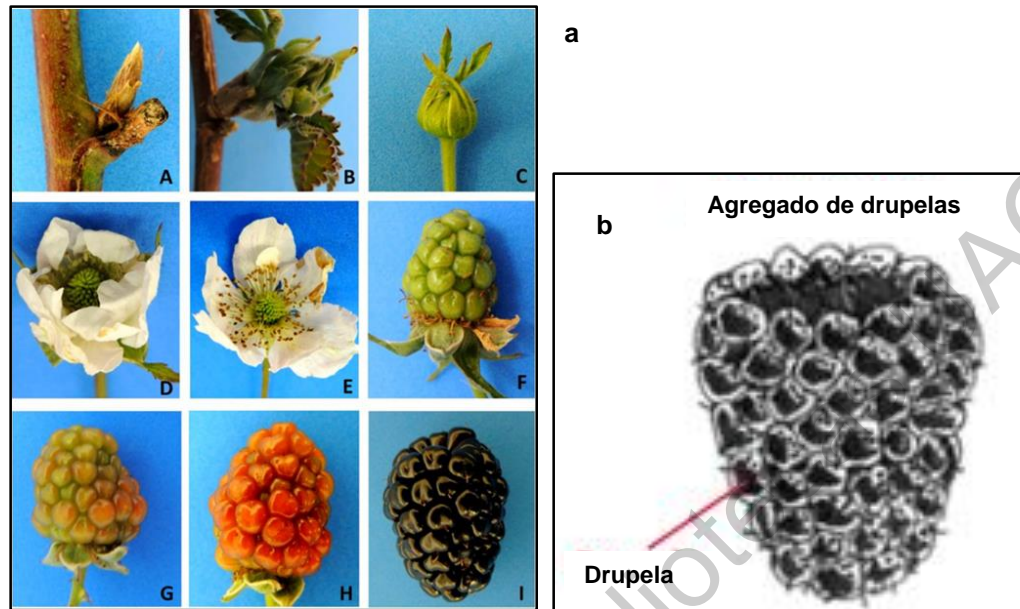


Figura 3. a. Estados fenológicos en el desarrollo del fruto de zarzamora. A) Brotes en etapa de dormancia, B) generación de los brotes, C) generación del capullo de la flor, D) apertura media de la flor, E) apertura completa de la flor, F) fruto inmaduro completo. **b.** Estructura típica del fruto de zarzamora.

2.7. Composición química de la zarzamora.

2.7.1. Contenido de carbohidratos.

El sabor de los productos hortícolas es una característica principal de calidad y de este depende en gran medida la aceptación del producto por parte del consumidor. Por ello, el contenido de carbohidratos en la frutilla es uno de los parámetros más importantes en la producción de zarzamora, ya que en conjunto con los ácidos orgánicos presentes en la frutilla son los dos principales factores que afectan el sabor (Strik et al., 2007). La cosecha de la zarzamora debe realizarse cuando la fruta alcance la madurez necesaria en la que el contenido de azúcares simples sea suficiente para balancear los contenidos de acidez y la astringencia (Strik et al., 2007).

El contenido de azúcares simples de las frutillas maduras generalmente es una mezcla equimolar de glucosa y fructosa, mientras que la concentración de sacarosa variará en base al estado de madurez del fruto y la duración del almacenamiento Poscosecha. La sacarosa juega un papel importante en el desarrollo temprano de la zarzamora y generalmente es el carbohidrato en mayor cantidad en dichas etapas, y su importancia radica en que puede ser convertido a glucosa y fructosa durante las etapas tempranas de desarrollo y esta conversión puede continuar durante el almacenamiento poscosecha. La sacarosa al ser un compuesto generado por la unión de α -D-glucopiranososa con la β -D- fructofuranosa se considera como un compuesto no reductor, por lo que no puede ser utilizado como sustrato principalmente para los procesos respiratorios de las frutillas. Por ende, su hidrolisis se debe llevar a cabo para poder usar sus sustituyentes como sustratos metabólicos, esto, con la ayuda de enzimas invertasas, las cuales tienen una mayor actividad enzimática durante la maduración del fruto, generando grandes concentraciones de glucosa y fructosa (Strik et al., 2007). Los datos del contenido nutricional de la zarzamora se muestran en la Tabla 3.

2.7.2. Contenido de vitaminas y minerales.

Las frutillas, entre ellas la zarzamora, poseen una importante cantidad de nutrientes como vitaminas y minerales que tienen un efecto importante sobre la salud humana.

Las berries se caracterizan principalmente por su alta cantidad de diversos componentes como el ácido fólico, vitamina B como la niacina, tocoferoles y vitamina K, la cual es un componente importante en la salud de los seres humanos (Strik et al., 2007).

Tabla 3. Contenido de carbohidratos y composición proximal de la zarzamora.

Componente	
Agua (g H ₂ O/100 g PF)	88.2
Energía (Kcal)	43
Proteínas (g)	1.39
Lípidos totales (g)	0.49
Cenizas	0.37
Carbohidratos (g)	9.61
Fibra total (g)	5.3
Azúcares totales (g)	4.88
Sacarosa (g)	0.07
Glucosa (g)	2.31
Fructosa (g)	2.4
Maltosa (g)	0.07
Galactosa (g)	0.03
Almidón (g)	ND

La vitamina A, el ácido fólico, el ácido ascórbico y la vitamina K son las vitaminas más importantes (Tabla 4). Por su parte, los minerales de mayor concentración en las berries son el potasio, el fósforo, el calcio y el magnesio (Tabla 5). Los contenidos pueden variar según la variedad (Beattie et al., 2005; Lee y Kader, 2000). De igual manera, las frutillas tienen importantes cantidades de polifenoles, que ejercen un gran efecto antioxidante tanto en el metabolismo de las frutillas como en el metabolismo de los seres humanos (Beattie et al., 2005; Lee y Kader, 2000).

Tabla 4. Contenido de vitaminas en frutos de zarzamora.

Componente	
Ácido ascórbico total (mg)	21
Tiamina (mg)	0.002
Riboflavina (mg)	0.003
Niacina (g)	0.65
Ácido pantoténico (mg)	0.28
Vitamina B6 (mg)	0.003
Ácido fólico total (µg)	25
Vitamina B12 (µg)	ND
Vitamina A (IU)	214
α tocoferol (mg)	1.17
β tocoferol (mg)	0.004
γ tocoferol (mg)	1.34
Δ tocoferol (mg)	0.9
Vitamina K (µg)	19.8

Tabla 5. Contenido de minerales de la zarzamora.

Componente	
Calcio (mg)	29
Fierro (mg)	0.62
Magnesio (mg)	20
Fosforo (mg)	22
Potasio (mg)	162
Sodio (mg)	1
Zinc (mg)	0.53
Cobre (mg)	0.17
Manganeso (mg)	0.65
Selenio (mg)	0.4

2.7.3. Ácidos orgánicos.

En las zarzamoras, y en general en las berries, el contenido de azúcares se contrarresta por la presencia de diversos ácidos orgánicos, como el ácido cítrico y el ácido málico, los cuales son los de mayor concentración, además, la presencia de ácidos fenólicos, los cuales tienen la capacidad de impartir un sabor ácido y astringente en las frutillas. Los ácidos orgánicos y fenólicos, en conjunto, son los responsables de la acidez titulable de las frutillas, y este parámetro es usado como un parámetro de calidad de las zarzamoras, mientras que el valor de pH (2.82) generalmente se considera como un parámetro no concluyente en la calidad de las frutillas (Miesle et al., 1991; Viljakainen et al., 2002).

Altas concentraciones de ácidos orgánicos en las frutillas, principalmente de ácido ascórbico, se consideran críticas para su conservación, ya que estas altas concentraciones ayudan a prolongar la vida de anaquel de las frutillas manteniendo la estabilidad de las antocianinas de las frutillas (Miesle et al., 1991; Viljakainen et al., 2002).

2.7.4. Factores bioquímicos del deterioro: Enzimas.

La presencia de varias enzimas como las hidrolasas y oxidasas tanto en fruto fresco como en fruto dañado, causan un importante deterioro en la calidad de las frutillas, incluyendo la textura y el color que incluyen la formación de coloraciones marrones en la frutilla.

La presencia de enzimas oxidantes se ha reportado en una gran cantidad de variedades de zarzamora, provocando un efecto perjudicial en el color, componentes nutricionales y en la aceptación por parte del consumidor. El grado de oscurecimiento de las frutillas a causa de la acción de enzimas como la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD), inicialmente es contrarrestado por la acción de diversos compuestos como las antocianinas, sin embargo, por eventuales reacciones de oxidación secundaria y de condensación, terminan afectando la calidad de las frutillas (Cano et al., 1997; Miesle et al., 1991; Vicente et al., 2005).

Generalmente la polifenol oxidasa (PPO), actúa catalizando reacciones de oxidación de diversos compuestos fenólicos, lo cual eventualmente lleva a reacciones de polimerización de los compuesto fenólicos, provocando un cambio de color asociado a la formación de melanoidinas (Cano et al., 1997; Miesle et al., 1991; Vicente et al., 2005).

Al día de hoy, se hace uso de diversas técnicas para reducir el daño producido por la actividad de diversas enzimas. Entre las principales técnicas se encuentran hacer un buen uso de la refrigeración, atmósferas cuya concentración de oxígeno sea reducida, modificación del pH, la adición de inhibidores enzimáticos y la adición de agentes reductores para lograr un control secundario de los productos generados por las reacciones de oxidación (Cano et al., 1997; Miesle et al., 1991; Vicente et al., 2005).

Actualmente se sabe que la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD), son las principales responsables de la degradación de los compuestos fenólicos de las frutillas y de la pérdida de diversas características de calidad y su actividad está relacionada con procesos fisiológicos como la maduración, y la estabilidad de las frutillas durante el almacenamiento poscosecha (Cano et al., 1997; Miesle et al., 1991; Vicente et al., 2005).

Además, las enzimas de la degradación de la pared celular son un factor importante que afecta la calidad general de las frutillas y están relacionadas con la vida poscosecha de las zarzamoras. Puesto que las zarzamoras no poseen un pericarpio protector y en cambio solamente poseen una delgada cutícula, son particularmente susceptibles al daño por la acción de las enzimas de la degradación de la pared celular (Cano et al., 1997; Miesle et al., 1991; Vicente et al., 2005).

2.8. Composición fitoquímica de la zarzamora.

Las zarzamoras al igual que la amplia gama de frutillas (berries), se caracterizan por su enorme calidad y beneficios para la salud.

Generalmente, el color de las zarzamoras, el cual va de colores purpuras a negro, así como su sabor y olor, son características otorgadas por la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas de las zarzamoras.

Recientemente, las investigaciones científicas se han enfocado en los fitoquímicos, los cuales son compuestos naturales de la planta con importantes características bioactivas y su efecto contra desordenes crónicos en el organismo. Por esto, se sabe que las zarzamoras son una gran fuente de fitoquímicos, principalmente compuestos polifenólicos, como flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavan-3-oles, y proantocianidinas) (Strik et al., 2007).

2.8.1. Compuestos fenólicos y sus derivados.

Los ácidos fenólicos predominantes en las berries son el ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxicinámico, así como los elagitaninos, los cuales constituyen otra clase de compuestos fenólicos.

Los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico son compuestos que no se encuentran en su forma libre, por lo que se encuentran más comúnmente en sus formas conjugadas formando ésteres y glucósidos. Estos compuestos se pueden encontrar disueltos en la vacuola, o en su forma insoluble si se encuentran unidos a polisacáridos de la pared celular. Generalmente, los ácidos fenólicos son analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) después de ser sometidos a un tratamiento de hidrolisis alcalina, por lo cual, a través de esta técnica se ha logrado identificar gran parte de estos compuestos. La estructura y tipos de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico se muestran en la figura 4 y en las tablas 6 y 7. (Beattie et al., 2005)

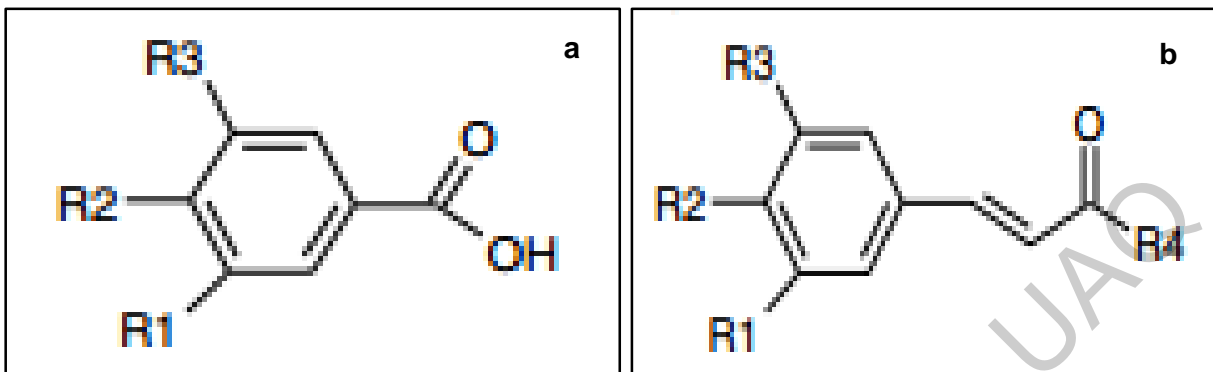


Figura 4. Estructura del ácido hidroxibenzoico (a). Estructura del ácido hidroxicinámico (b).

Tabla 6. Principales ácidos hidroxibenzoicos.

Ácidos	R1	R2	R3
p- ácido hidroxibenzoico	H	OH	H
Ácido protocatecuico	H	OH	OH
Ácido vainílico	CH ₃ O	OH	H
Ácido siríngico	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Ácido gálico	OH	OH	OH

Tabla 7. Principales ácidos hidroxicinámicos.

Ácidos	R1	R2	R3	R4
m- cumárico	Oh	H	H	OH
p- cumárico	H	OH	H	OH
Cafeico	H	OH	OH	OH
Ferúlico	CH ₃ O	OH	H	OH
Sinámico	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	OH
Cafeoilquínico	H	OH	OH	Ácido quínico
Cumaroilquínico	OH	H	H	Ácido quínico

2.8.2. Antocianinas.

Las antocianinas, cuyo nombre proviene del griego (derivado de los prefijos griegos *anthos* = flor y *Kyanos* = azul), son los pigmentos responsables de diversas coloraciones rojas y azules de frutos, vegetales y flores (Chandra et al., 1992). Estructuralmente, las antocianinas poseen un esqueleto carbonado $C_6C_3C_6$, típico de los flavonoides; son derivados polihidroxi y polimetoxi del catión flavilio. En la naturaleza existen alrededor de 4000 estructuras flavonoides de las cuales alrededor de 260 pertenecen a la familia de las antocianinas (Figura 5). A la estructura general sin grupos esterificados se le conoce como antocianidinas o aglicona donde el catión flavilio es una parte muy importante. Estas antocianidinas generalmente se encuentran esterificadas con azúcares y grupos acilo en diferentes posiciones de la antocianidina (Francis., 1989).

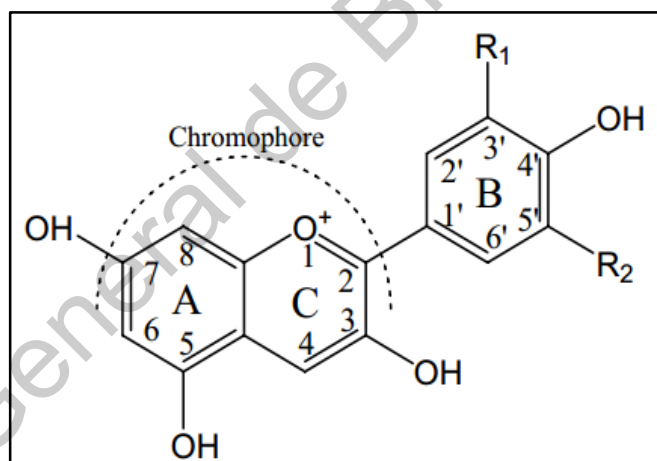


Figura 5. Estructura básica de las antocianidinas.

La presencia de grupos funcionales hidroxilo y metilo en diferentes posiciones de la aglicona genera las diferentes antocianidinas conocidas que se caracterizan por la presencia de dobles enlaces conjugados en toda la estructura responsables de la absorción de la luz alrededor de 500 nm (Tabla 8), usualmente son penta o hexa sustituidas.(Francis, 1989).

Tabla 8. Grupos funcionales en diferentes carbonos de la estructura de las antocianidinas.

Antocianidina	3	5	6	7	3'	4'	5'	Color
Apigenina	H	OH	H	OH	H	OH	H	Naranja
Luteolidina	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Naranja
Triacetidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Naranja
Aurantidina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Naranja
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Naranja/rojo
5-metylcianidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Naranja/rojo
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Rojo
Rosinidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Rojo
6-hidroxicianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Rojo
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo-azulado
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Rojo-azulado
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OH	Rojo-azulado
Pulchenidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Rojo-azulado
Euopinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Rojo-azulado
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Rojo-azulado
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Rojo-azulado

Los grupos hidroxilo o metoxilo de las agliconas pueden ser esterificados por carbohidratos y a su vez estos carbohidratos se pueden unir a otros carbohidratos mediante enlaces glicosídicos o a ácidos orgánicos (ácido cinámico, acético, entre otros) mediante enlaces éster dando lugar a las antocianinas.

La glicosilación y la acilación tienen un efecto sobre las características físicas y químicas, modificando el tamaño y polaridad. La glicosilación incrementa la solubilidad en agua, mientras que la acilación la disminuye (Francis, 1989)

La glicosilación mejora la estabilidad de las antocianinas, esto se logra mediante la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares en la antocianina. La glucosa y la ramnosa son los azúcares más comunes que se unen a la aglicona, aunque también se han descrito uniones con la galactosa, arabinosa, xilosa, rutinosa y la sambubiosa. Los ácidos orgánicos unidos a las antocianinas pueden ser alifáticos y ácidos cinámicos. Debido a varios tipos de sustituciones, existe una gran diversidad de antocianinas (Figura 6). (Francis, 1989)

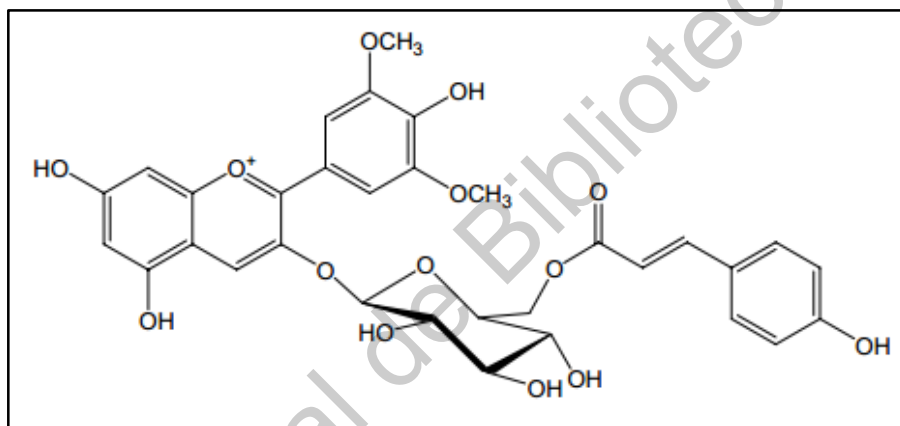


Figura 6. Estructura química de una antocianina sustituida con un azúcar y esterificada con un ácido cinámico.

La estabilidad de las antocianinas no solamente depende de sus sustituyentes, también depende de otros factores como el pH y la temperatura, como se muestra a continuación;

2.8.2.1. pH.

Las antocianinas pueden sufrir cambios estructurales dependiendo del pH del medio en que se encuentren. En base a esto, existen en equilibrio cuatro formas estructurales de las antocianinas: catión flavilio, base quinoidal, la pseudobase carbinol, y las chalconas.

A valores de pH por debajo de 2.0, las antocianinas se encuentran en forma de catión flavilio. A pH de 3.0-6.0, el catión flavilio se hidrata rápidamente en la posición C-2, generando una pseudobase incolora llamada carbinol. Los diferentes cambios que presentan las antocianinas en función del pH del medio se muestran en la Figura 7.

Diversos trabajos han demostrado que el proceso de hidratación es bastante rápido, dependiendo de la intensidad en el cambio de pH en el medio, mientras que la transición de la pseudobase carbinol al catión flavilio es casi instantánea cuando el medio se acidifica (Francis, 1989). Los diferentes cambios que presentan las antocianinas en función del pH del medio se muestran en la Figura 7.

2.8.2.2. Temperatura.

Los estudios cinéticos de degradación de las antocianinas, han establecido una relación logarítmica entre la temperatura y la tasa de degradación. El mecanismo señala una relación directa de transformación de las estructuras a medida que se incrementa la temperatura, mientras que la apertura del anillo C de las chalconas promueve la aparición de coloraciones marrones. No obstante, también se ha observado que al someter a las antocianinas a tratamientos térmicos por cortos periodos de tiempo se incrementa su estabilidad, esto gracias a la inactivación de las principales enzimas responsables de la degradación de las antocianinas (Francis, 1989).

2.8.2.3. Efecto de enzimas.

Las enzimas como la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD) al quedar liberadas de sus compartimentos celulares durante la extracción de las antocianinas, aceleran la degradación de las mismas. El pardeamiento enzimático junto con la pérdida de color, pueden ocurrir casi instantáneamente a la extracción de las antocianinas. No obstante, diferentes estudios han demostrado que la polifenol oxidasa (PPO) no reacciona directamente con las antocianinas; pero son capaces de generar quinonas mediante la oxidación de otros fenoles que

posteriormente reaccionan con las antocianinas a través de reacciones de condensación.

En presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la PPO es capaz de oxidar ácidos fenólicos a sus respectivas quinonas, las cuales se polimerizan con las antocianinas incrementando su degradación y pardeamiento (Francis, 1989).

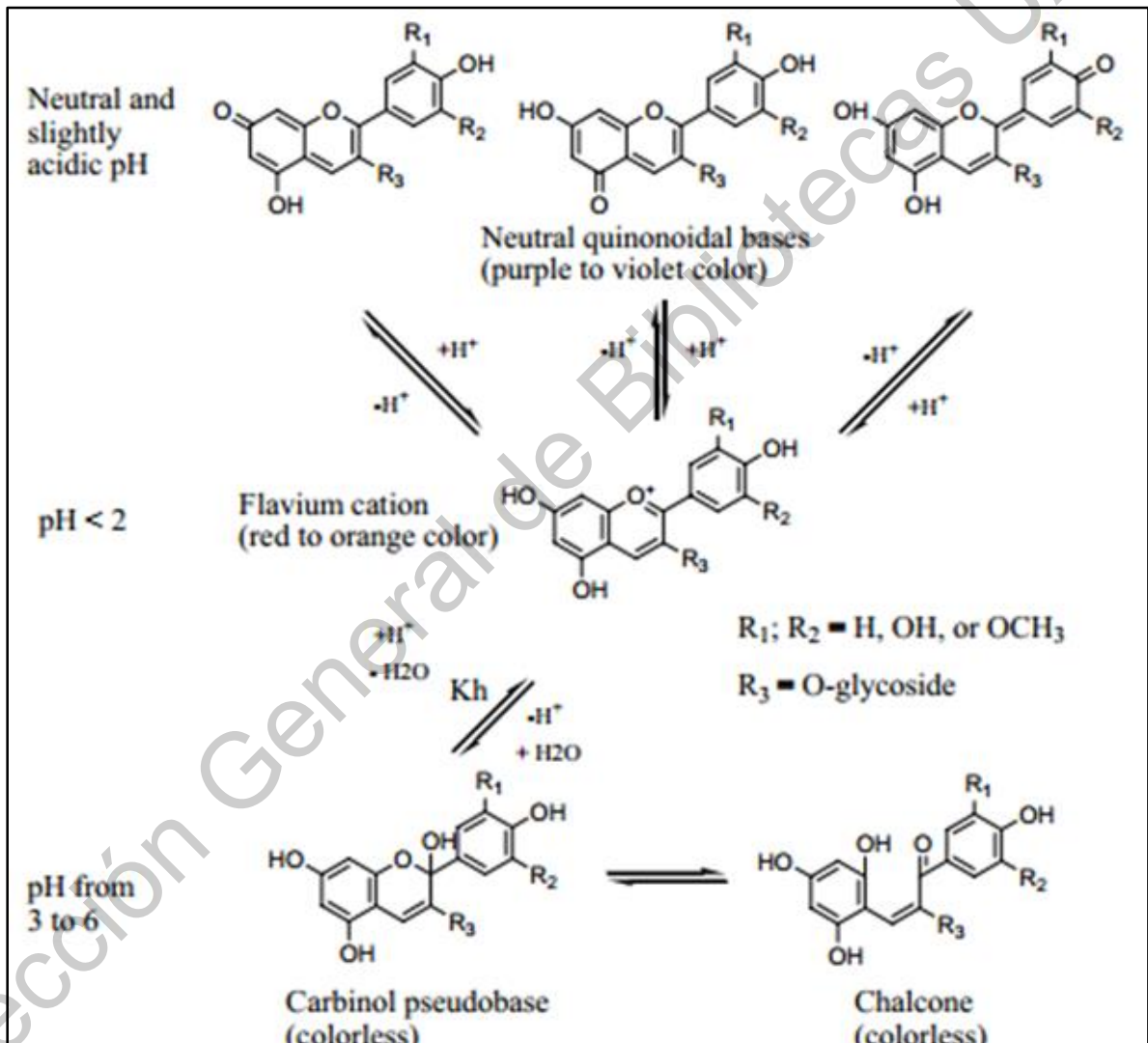


Figura 7. Cambios estructurales de las antocianinas a diferentes valores de pH en el medio.

2.9. Manejo poscosecha de las zarzamoras.

La producción de frutillas de alta calidad en campo debe combinarse con un excelente manejo poscosecha de las mismas que incluyen una cosecha cuidadosa, empaque en campo utilizando empaques apropiados, paletizado adecuado, evitar demoras en enfriar, enfriado rápido mediante técnicas que logren la remoción del calor de campo en 1-2 horas, transporte apropiado y una efectiva labor de comercialización.

2.9.1. Requerimientos de enfriado poscosecha.

La remoción del calor de campo de las frutillas debe ocurrir lo más pronto posible después de su cosecha para maximizar su vida de anaquel. Para el caso particular de estas frutas, es importante evitar los daños mecánicos; por ello su empaque se realiza directamente en campo, dentro del huerto se verifica el peso y calidad de los frutos y se conforman las cajas que deben ser enviadas al pre enfriado (Dutta, 2010).

El pre enfriado consiste en la remoción del calor de campo antes de su almacenamiento previo al envío a los mercados de destino. No obstante, también las fluctuaciones de temperatura durante el transporte y conservación tienen un efecto altamente negativo en la calidad de la fruta (Dutta, 2010).

El enfriado con aire forzado es la técnica más recomendada para la eliminación del calor de campo en este tipo de frutas. No obstante la operación de estos equipos de manera industrial no se realiza adecuadamente y el proceso genera perfiles de temperatura heterogéneos en la carga con los consecuentes problemas de alteraciones de calidad en los lotes de envíos. La temperatura de almacenamiento óptimo de zarzamora es de 0.5-0 °C con una humedad relativa de 90-95% (Dutta, 2010).

2.9.2. Almacenamiento en atmósferas controladas.

La senescencia de productos altamente perecederos, como las zarzamoras frescas, resulta de su propio metabolismo a través de los procesos de respiración. Estos productos continúan su metabolismo respiratorio para generar energía y metabolitos intermediarios oxidando los carbohidratos, consumiendo oxígeno del aire y liberando dióxido de carbono, ATP y calor al medio ambiente (Dutta, 2010).

La vida de anaquel de las frutas es inversamente proporcional a la tasa de respiración. El uso de atmósferas controladas en combinación con las bajas temperaturas, disminuye la tasa de respiración de las frutillas a través de un continuo reajuste en las concentraciones de gases dentro de las cámaras de almacenamiento logrando incrementos en la vida de anaquel.

Las atmósferas controladas fueron diseñadas para preservar la calidad poscosecha de frutas y hortalizas debido a la reducción de la tasa respiratoria; como un beneficio adicional, tienen efecto sobre la carga microbiana asociada a los productos, ya que limita su desarrollo.

La composición de las atmósferas controladas para estas frutas es de 5-10% de O₂ y 15-20% de CO₂; estos niveles ayudan a controlar el desarrollo de hongos como *Botrytis. Cinerea*, además disminuye el ablandamiento de la fruta.

A través de la reducción de los niveles del oxígeno y el incremento en los niveles de dióxido de carbono se reducen la actividad de enzimas involucradas en las síntesis del etileno así como de la actividad de la lipoxigenasa, la cual está involucrada en la generación de compuestos volátiles aromáticos.

Elevadas concentraciones de CO₂ (más del 50%) resulta en una menor proporción de producto con daño por frío. Sin embargo, la alteración de las enzimas del sistema respiratorio incrementa el deterioro de las frutillas después de 8 días de almacenamiento. Concentraciones mayores a 20% de CO₂ son capaces de causar pérdidas de color en las frutillas, así como menor firmeza y pérdida de sabor y olor.

A través de diversas pruebas sensoriales en frutillas tratadas con atmósferas controladas, se ha observado que altas concentraciones de CO₂ provocan la pérdida de características de calidad como el sabor y el olor, sin embargo, un secuencial almacenamiento con 50% CO₂ seguido por almacenamiento en aire convencional por varios días antes de la comercialización elimina este problema (Dutta, 2010). Aunque el sistema no es aplicable a nivel comercial debido a las complicaciones que tiene el cambio de atmósferas en tiempos tan cortos.

A lo largo de los últimos años, diversos autores han realizado diversas investigaciones con la intención de dilucidar el verdadero efecto que tienen las altas concentraciones de CO₂ sobre el metabolismo bioquímico de los frutos sometidos a dichas condiciones.

Se ha comprobado que las altas concentraciones de dióxido de carbono logran detener de manera significativa el metabolismo celular, a través de la inactivación principalmente de enzimas relacionadas con el metabolismo catabólico, logrando preservar las características de calidad deseadas en la frutilla.

Bodelón et al., (2010) evaluó el efecto de atmósferas con 20% de CO₂ por 3 días de exposición en fresas sobre el contenido de azúcares del metabolismo celular como fructosa, glucosa, sacarosa, además de los sólidos solubles totales y la acidez total. Los resultados mostraron una clara disminución en el contenido de fructosa y glucosa, lo cual indica una menor actividad tanto de la sacarosa sintasa como de la sacarosa invertasa. De igual manera registraron una disminución significativa en el contenido de sólidos solubles totales.

Brackmann et al., (2016) evaluaron el efecto de exposición por 12 días tres distintas composiciones atmosféricas (5% O₂ + 15% CO₂, 5% O₂ + 10% CO₂ y 10% O₂ + 10% CO₂) sobre los parámetros de calidad de zarzamoras variedad "Guarani" provenientes de Brasil. Dichos autores encontraron una reducción significativa en el contenido de sólidos solubles totales así como un mayor porcentaje de frutos sanos.

Pese a los resultados positivos obtenidos en dicha investigación, y haber sido realizada en frutos de zarzamora, los resultados no pueden ser concluyentes y no pueden ser extrapolados a las variedades mexicanas, ya que la aplicación de atmósferas controladas por 12 días resulta logística y económicamente no viable.

Imlak et al., (2017) a través de la implementación de 3 composiciones de atmósferas controladas (0, 3, 5 y 10% CO₂) lograron disminuir el contenido de sólidos solubles totales conforme se incrementó la concentración de dióxido de carbono. Por último, Perkins et al., (2002) redujeron de manera significativa el contenido de sólidos solubles totales en zarzamoras de la variedad "Navaho" sometidas a atmósferas controladas con una composición de 10%O₂ + 15% CO₂.

2.10. Especies reactivas de oxígeno (ERO`s)

A nivel de tejido, las especies reactivas de oxígeno (ERO`s) se originan como una consecuencia directa del metabolismo respiratorio, generadas a partir de una reducción parcial del oxígeno, generando un estado de estrés oxidativo provocando daño celular.

Grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno como superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo, radicales peróxido, radicales alcóxidos, entre otros, son generados dentro del metabolismo normal de la célula y gracias a un sistema contra el ataque oxidativo estos radicales son degradados dentro de las propias células. No obstante, también estos radicales tienen funciones fundamentales en las respuestas de la planta contra el ataque de patógenos.

Por otro lado, cuando las plantas o partes de ella son sometidas a estrés biótico o abiótico se induce un desbalance en el metabolismo que provoca una mayor producción de especies reactivas. Las fuentes de especies reactivas de oxígeno incluyen la fuga de electrones del sistema de transporte de electrones, la descompartmentalización del hierro que facilita la generación del radical hidroxilo (Dutta, 2010).

Se ha estimado que aproximadamente el 1% del O₂ consumido por las plantas es desviado para la generación de ERO`S (del Río et al., 1992; Elstner, 1997).

A lo largo de la evolución, las plantas superiores han hecho del oxígeno un componente de gran importancia para el funcionamiento de la mayoría de las reacciones metabólicas. Esto a su vez trajo consecuencias las cuales se traduce en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO`s) a través del metabolismo respiratorio, la fotosíntesis y la fotorrespiración; estas reacciones se llevan a cabo en los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas. (Arora et al., 2002; Bhattacharjee, 2005; Alscher, 1997; Miller et al., 2008; Montero et al., 1996).

La generación de prooxidantes en forma de ERO`s es delicadamente regulada por el sistema antioxidante de la planta. Una exposición prolongada de la planta a las ERO`s provoca estrés oxidativo, el cual cambia el balance en favor de los prooxidantes. Las especies reactivas de oxígeno capaces de causar daño a la integridad de la célula son el anión superóxido (O₂⁻), radical per hidroxilo (HO₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo ([·]OH), radical alcoxi (RO[·]), radical peroxilo (ROO[·]), oxígeno singulete (¹O₂), entre otros. Durante la reducción del O₂ a H₂O, se forman las especies O₂⁻, H₂O₂ y [·]OH (Figura 8). El radical superóxido, es altamente reactivo en ambientes hidrofóbicos como el interior de las membranas, se genera en las células vegetales en un proceso denominado explosión oxidativa. Por otro lado, la forma protonada del superóxido, el radical per hidroxilo (HO₂⁻) es más reactivo que el propio superóxido (Elstner, 1997). Adicionalmente, el superóxido se puede dismutar para formar peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Un radical aún más reactivo puede ser formado a partir de O₂⁻ y H₂O₂, el radical hidroxilo ([·]OH) a partir de la reacción de Haber-Weiss catalizada por Hierro (Fe).

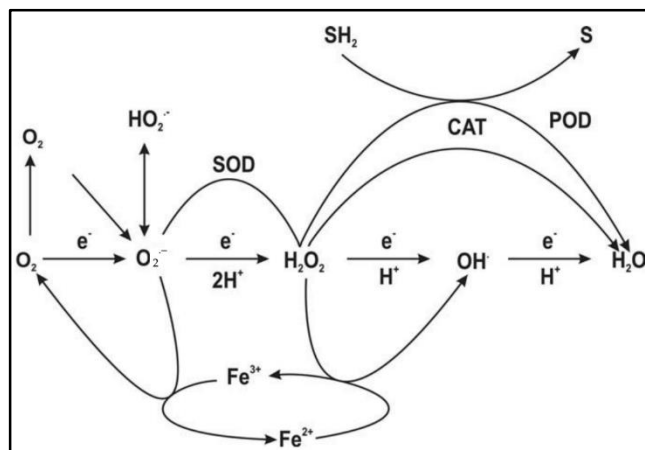


Figura 8. Generación e interconversión de especies reactivas de oxígeno derivadas de O₂.

El radical superóxido es moderadamente reactivo y tiene una vida media relativamente corta de aproximadamente 2-4 μ s (Dat et al., 2000).

El superóxido no puede pasar libremente a través de las membranas biológicas por lo que es rápidamente dismutado en presencia de dos protones a peróxido de hidrógeno. Por su parte el peróxido de hidrógeno es moderadamente reactivo y con una vida media de 1 ms y puede difundir grandes distancias desde su punto de producción (Dat et al., 2000).

2.10.1. Generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ERO`S).

La cadena transportadora de electrones en la mitocondria, también es fuente importante de especies reactivas de oxígeno (Figura 9), incluyendo superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Haliawell et al., 1999).

La reducción directa del O₂ a O₂^{•-} se lleva a cabo en la región flavo proteica de la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria.

La generación de superóxido en la cadena transportadora mitocondrial es altamente favorecida por la presencia de Antimicina A, que bloquea el flujo de electrones a través de la ubiquinona (Figura 9).

Esto resulta en la acumulación de ubiquinona reducida la cual sufre una autooxidación, dando paso a la generación del radical superóxido. Diversas observaciones revelan que la ubiquinona es la principal generadora de peróxido de hidrógeno en la cadena transportadora de electrones mitocondrial y aparentemente el radical superóxido es el precursor para la generación de peróxido de hidrógeno.

La generación de peróxido de hidrógeno en los peroxisomas y en los cloroplastos es aproximadamente 30 a 100 veces más rápida que la generación de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias. En efecto, la producción mitocondrial de ERO`s no es afectada por la incidencia de luz u oscuridad, por lo que el consumo total de O_2 es mayormente afectado por el ciclo de Krebs. Sin embargo, la producción del radical superóxido puede cambiar por la acción de la enzima oxidasa alterna (Dutilleul, 2003). Se ha determinado que la oxidasa alterna tiene gran influencia en la generación de ERO`S y está involucrada en la supervivencia de las células vegetales cuando se encuentran bajo estrés (Maxwell, et al, 1999; Robson y Vanlerberghe, 2002).

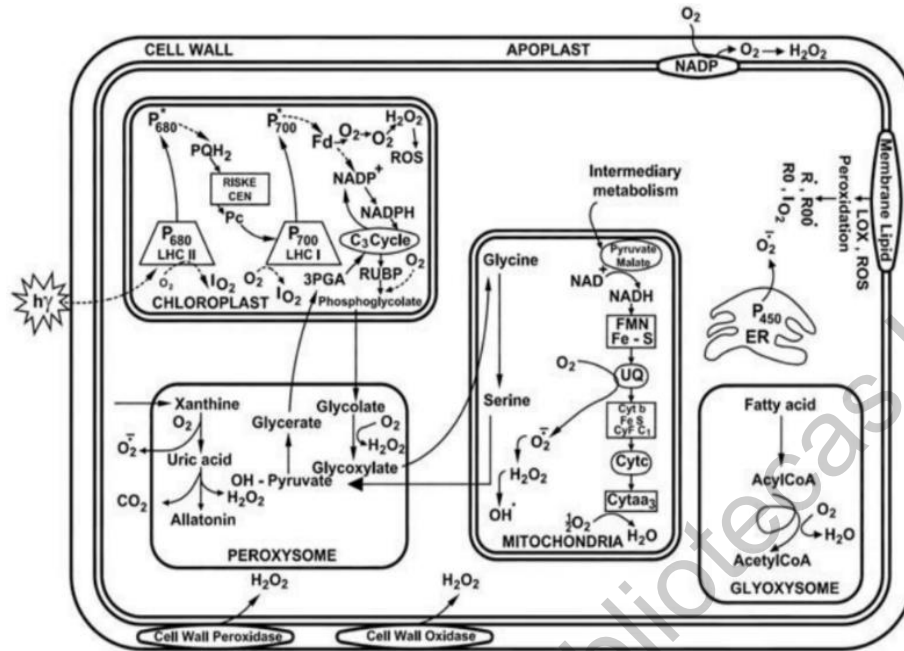


Figura 9. Fuentes y sitio de generación celular de especies reactivas de oxígeno.

2.10.2. Otras fuentes enzimáticas generadoras de ERO'S.

Adicionalmente al ciclo del glicolato, el peróxido de hidrógeno puede ser generado como producto secundario en otras reacciones enzimáticas del tipo oxidadas. La degradación de purinas por la acción de la xantina oxidasa y la oxidación de mono, di ó poliaminas por la acción oxidadas o la oxidación de fenoles a través de la PPO (Haliawell et al., 1999). De igual manera, el peróxido de hidrógeno puede ser producido como un subproducto de la oxidación enzimática de los azúcares (Apel y Hirt, 2004).

2.10.3. El estrés medio ambiental y la producción de especies reactivas de oxígeno.

Cualquier condición en la cual la homeostasis es alterada y produce un desbalance en el estado redox, puede desencadenar la producción de especies reactivas de oxígeno.

Cambios en las condiciones ambientales como variaciones en la temperatura, humedad, disponibilidad de agua, estrés salino, intensidad lumínica, herbicidas, exposición a metales pesados, radiación UV y la contaminación del aire pueden desencadenar la producción de ERO`S e inducir el daño oxidativo en las células vegetales (Apel y Hirt, 2004; Bartoli, et al., 1999; Bhattacharjee, 2005; Elstner, 1997; Alscher, 1997; Imlay, 2008).

2.10.4. Estrés por deshidratación y salinidad.

El estrés por agua en las plantas puede desencadenar el incremento en la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno los cuales son capaces de encabezar eventos de deterioro oxidativo en las plantas (Bartoli et al., 1999).

Evidencias experimentales indican que la producción de ácido abscísico es la respuesta a dicho estrés, ya que tiene la capacidad de reducir la pérdida de agua en las células vegetales. La acción del ácido abscísico se da a nivel de estomas reduciendo la disponibilidad del CO₂ y con ello el ciclo de reducción del carbono fotosintético (PCRC), esto facilita la formación de ERO`S de los fotosistemas I y II (Jiang y Zhang, 2001). Esa misma función del ácido abscísico potencia la peroxidación de los lípidos de la membrana asociados a daños en la integridad celular. No obstante, también se ha establecido claramente que el ácido abscísico puede imponer diferentes estados de estrés oxidativo, que pueden inducir respuestas de la planta y mejoran su tolerancia al estrés oxidativo (Jiang y Zhang, 2001).

2.10.5. Estrés por temperatura.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO`S) juegan un papel crítico en la supervivencia y rendimiento de las plantas bajo estrés de temperatura. Diversos experimentos, al someter ciertos organismos a elevadas temperaturas y daño por frío mostraron un incremento en las concentraciones de peróxido de hidrógeno H₂O₂ (Bhattacharjee, 2005).

La actividad de ciertas enzimas eliminadoras de ERO`S como la catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa disminuyeron en proporción a la duración del estrés, disminuyendo las concentraciones de ERO`S. La acumulación de peróxido de hidrógeno en las células vegetales es una respuesta a exposición a temperaturas subóptimas de desarrollo (Prasad, 1994). Como respuesta a las acumulación de ERO`s, se observa un incremento en la Cu/Zn SOD citosólica, mientras que los niveles de SOD tanto mitocondrial como cloroplástico se mantuvieron inalterados. Esto sugiere que el citosol es el sitio de producción de ERO`s bajo estrés de temperatura (Prasad, 1994).

2.10.6. Mecanismos de regulación de especies reactivas de oxígeno (ERO`s) en células vegetales.

Debido a la alta citotoxicidad y a la naturaleza reactiva de las ERO`S, su acumulación en tejidos sanos debe mantenerse bajo control. Las plantas tienen un elaborado sistema defensivo para la protección, principalmente enzimas antioxidantes contra los efectos de altas concentraciones de ERO`S. Uno de los principales sistemas de defensa contra las ERO`S son las enzimas antioxidantes que incluyen la superóxido dismutasa (SOD), de la cual se conocen tres tipos:

CuZn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD. El tipo CuZn-SOD es encontrada principalmente en el citosol y en los cloroplastos, mientras que los tipos Mn-SOD y Fe-SOD son encontradas en la mitocondria, peroxisomas y cloroplastos (Dat et al., 2000).

La SOD más ampliamente distribuida a nivel celular es la CuZn-SOD; esta se encuentra en el citosol, cloroplastos, peroxisomas y en los tilacoides. Mientras que la Mn-SOD se encuentra en la matriz mitocondrial de todas las especies de plantas analizadas (Apel y Hirt, 2004; Scandalios, 1993).

Las enzimas responsables de la degradación del peróxido de hidrógeno son la peroxidasa y la catalasa. Las catalasas son encontradas en los peroxisomas y son extremadamente sensibles al daño oxidativo por el superóxido.

Existen pequeñas cantidades de catalasa en las mitocondrias y en los cloroplastos por lo que esta enzima no es muy efectiva eliminando el peróxido de hidrógeno de estos organelos.

Por otro lado, la ascorbato peroxidasa se ha reportado principalmente en el citosol de los cloroplastos y en la mitocondria. En los cloroplastos, la SOD y la APx se encuentran tanto en el estroma como en los tilacoides y representan el principal sistema en la eliminación de ERO`s. El superóxido generado en los cloroplastos, inmediatamente debe pasar a peróxido de hidrógeno por acción de la SOD, el cual posteriormente es eliminado por la APx.

La síntesis de APx y SOD es inducida bajo condiciones de estrés como temperatura, salinidad, alta intensidad de luz, exposición a altas concentraciones de ozono, exposición a luz UV, etc. La presencia de enzimas antioxidante como la glutatión reductasa y la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) de igual manera son sobre reguladas bajo diversas condiciones de estrés como las anteriormente mencionadas.

2.11. Uso de las ERO`S como factor poscosecha para mejorar la vida de anaquel

La literatura descrita en párrafos anteriores describe la producción de las especies reactivas de oxígeno en el metabolismo en diferentes organelos a nivel celular y las implicaciones que estas especies tienen en el estrés oxidativo.

En esta sección se describe la importancia que estas especies tienen en la conservación de frutas y hortalizas. El aspecto más estudiado y demostrado es el incremento en la producción de ERO`s como respuesta de las plantas al ataque de patógenos y no patógenos, en el caso de interacciones incompatibles parásito-huésped, esta respuesta puede ir precedida de un incremento ligero de ERO`s seguido de una explosión en la producción de los mismos, mientras que en el caso de interacciones compatibles no hay un incremento posterior de ERO`s.

La presencia de la explosión o producción continua de ERO`s se considera como el factor crítico para el desarrollo de resistencia de la planta al ataque de los patógenos. No obstante, también se ha indicado que la falta de la explosión oxidativa se debe a una capacidad del patógeno para suprimir la acumulación de compuestos oxidativos en las células huésped.

En este sentido, el uso de microorganismos como agentes de biocontrol de enfermedades, parecen asociarse a aquellos modelos de microorganismos compatibles.

No obstante, el mecanismo parece ser más complejo; Miller y Mittler., (2008) demostraron que las levaduras *Candida oleophila* y *Metschnikowia fructicola* producen mayores cantidades de radicales superóxido a medida que se desarrollan y estos generaron mayor cantidad de H₂O₂ en tejidos de manzana y cítricos dañados e inoculados con estas levaduras. Los frutos control y dañados también mostraron mayor producción de estos radicales pero en menor proporción.

A este respecto, dentro de los mecanismos señalados para resistencia al estrés que involucran las ERO`S se ha descrito que el hongo de control biológico, *Trichoderma virens*, secreta y libera un efector proteínico en tejidos de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Este efector es un polipéptido de 12,5 kDa que desencadena la producción de H₂O₂ en el tejido huésped e induce la expresión de genes relacionados con la defensa tanto a nivel local como sistémico, A su vez el H₂O₂ puede estar involucrado en una respuesta hipersensible mediada por una cascada de proteínas activada por mitógeno MAPK o MAP cinasas, la biosíntesis de lignina, inducción de factores de transcripción de choque térmico (Miller y Mittler, 2008), acumulación de genes de proteínas relacionadas a la patogénesis o genes PR y compuestos antimicrobianos como fitoalexinas (Araceli et al., 2007).

Las aplicaciones de ERO`s en la tecnología poscosecha se han centrado en el uso del ozono para reducir organismos patógenos, como se ha expresado en párrafos anteriores, y como elemento oxidar el etileno o inhibir su biosíntesis y con

ello incrementando la vida de anaquel de frutos como se ha descrito en kiwi donde se retasó la producción de etileno y la degradación de la pared celular y la expresión de genes relacionados a la degradación de la pared celular; en papaya con atmósferas con concentraciones menores de 5 ppm disminuyó la tasa de respiración y la producción etileno, pero interesantemente las concentraciones mayores mostraron actividades altas de PAL, peroxidasa y PPO. También se ha descrito que el ozono disminuye los efectos negativos del mismo en hortalizas.

De igual manera experimentaciones con ozono en diferentes concentraciones y tiempos de aplicación han demostrado un efecto benéfico en la composición del perfil fitoquímico y la incidencia de *B. cinerea* en varios productos.

Barth et al., (1995) evaluaron el almacenamiento prolongado con ozono sobre el contenido de antocianinas. Se evaluaron concentraciones de ozono de 0.0, 0.1 y 0.3 ppm por tiempos de exposición de 0, 2, 5 y 12 días de almacenamiento. Los resultados indican que la exposición de las frutillas dentro de las primeras 24 horas de exposición aumentan la concentración de antocianinas en las frutillas (9.1 mg/g), sin embargo, se observa una disminución en la concentración a partir del segundo día.

De igual manera, la exposición con ozono disminuyó considerablemente la actividad de la enzima peroxidasa. Giuggioli et al., (2015) evaluaron el efecto de concentraciones de ozono de 0.5 y 0.2 ppm por un tiempo de exposición de 12 horas sobre la calidad de almacenamiento de frambuesa.

Los resultados indican un aumento en la capacidad antioxidante de las frutillas conforme aumentan sus días de almacenamiento. Se obtuvo una mayor concentración de antocianinas en los tratamientos con ozono, sin embargo, la concentración de fenoles totales disminuyó en los tratamientos con ozono, respecto a lo obtenido con los tratamientos control.

Arnal et al., (2004) evaluaron concentraciones de ozono de 0.6 ppm, con tiempo de exposición de 16, 35 y 50 días sobre la firmeza y el porcentaje de pudriciones en frutos de Caqui “rojo brillante”.

Los resultados demostraron que la exposición al ozono disminuye considerablemente el % de pudriciones del fruto, obteniendo hasta un 32% de frutos podridos a los 50 días de almacenamiento con ozono, mientras que para el tratamiento control el % de frutos podridos representó el 100%. En contacto con el ozono se conservó de mejor manera la firmeza de los frutos con una carga de penetración de 18 N, mientras que los frutos control ya no presentaron resistencia alguna.

Gabler et al., (2010) evaluaron la aplicación de tratamientos con ozono a concentraciones de 10,000, 5,000 y 2,500 μL de ozono/L en uvas inoculadas con 1×10^6 conidios mL^{-1} logrando porcentajes de inhibición de *B. cinerea* de 72% para el control hasta 10% de incidencia en las concentraciones más altas.

Por último Sharpe et al., (2009) evaluaron la aplicación de tratamientos con ozono a concentraciones de 450 y 600 ppb en manzanas, arándanos y zanahorias logrando reducir considerablemente el porcentaje de viabilidad de las esporas a temperaturas de 5 y 20 °C. La viabilidad de las esporas se redujo prácticamente hasta cero a concentraciones de 600 ppb.

Bajo ese conjunto de información, este trabajo se enfocó a estudiar el efecto de aplicar atmósferas con ERO`s y atmósferas controladas sobre las características de químicas, bioquímicas y vida de anaquel de frutos de zarzamora.

3. JUSTIFICACIÓN

La producción de berries en México ha tenido un fuerte crecimiento en la última década y ha situado al país como el principal exportador de zarzamora en el mundo. Desde el punto de vista económico, los ingresos por las exportaciones de berries alcanzaron ingresos superiores a los 321 millones de dólares en el año 2017

No obstante, la zarzamora es un producto de alta tasa metabólica y altamente perecedero; por lo que es necesario contar con herramientas tecnológicas para su almacenamiento, manejo y transporte poscosecha para disminuir sus pérdidas poscosecha. Se han desarrollado tecnologías como las atmósferas controladas, las atmósferas modificadas y las atmósferas con ERO's que logran mantener la calidad de las frutillas por un tiempo más largo; no obstante, son escasos los reportes sobre sus aplicaciones en zarzamora.

Por ello es necesario determinar las condiciones óptimas de atmósferas controladas y de atmósferas con especies reactivas de oxígeno para prolongar la vida de anaquel de las zarzamoras y mantener sus características de calidad a través de la aplicación de atmósferas controladas y atmósferas con especies reactivas de oxígeno.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

4.1. Hipótesis

La implementación de atmósferas controladas, o con especies reactivas de oxígeno (ERO's) inducen diversas respuestas químicas y bioquímicas favorables que llevan a conservar las características de calidad y vida de anaquel de los frutos de zarzamora.

4.2. Objetivo general.

Evaluar el efecto de la exposición a atmósferas controladas y atmósferas ricas en especies reactivas de oxígeno (ERO's) en las respuestas químicas y bioquímicas, así como en la calidad poscosecha de frutos de zarzamora.

4.3. Objetivos específicos.

- Determinar la efectividad de las aplicaciones de atmósferas controladas para mantener la calidad y alargar la vida de anaquel de frutos de zarzamora cv 'Tupy'
- Determinar la efectividad de la exposición de frutos de zarzamora a atmósferas ricas en especies reactivas de oxígeno (ERO's) para mantener la calidad y alargar la vida de anaquel de frutos de zarzamora cv 'Tupy'.
- Evaluar las respuestas químicas y bioquímicas en frutos de zarzamora por efecto de tratamientos de atmósferas con especies reactivas de oxígeno (ERO's) y de atmósferas controladas durante el almacenamiento poscosecha.
- Determinar el efecto de la aplicación de atmósferas controladas y de atmósferas con especies reactivas de oxígeno en el metabolismo de la pared celular de frutos de zarzamora durante su almacenamiento poscosecha.
- Determinar el efecto de las aplicaciones de atmósferas controladas y de atmósferas con especies reactivas de oxígeno (ERO's) en el metabolismo oxidativo de frutos de zarzamora.

5. METODOLOGÍA

El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

5.1. Material biológico.

El desarrollo del presente proyecto se realizó con frutos de zarzamora de la variedad "Tupy", producidas en la zona de Zamora, Michoacán y cosechados por una empresa exportadora de zarzamora; los frutos fueron empacados en campo en clamshells de 12 oz (190g) y puestos en cajas de cartón corrugado de 12 clamshells de capacidad. Una vez empacados, fueron pre-enfriados en un túnel de aire forzado hasta 1°C y finalmente trasladados al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) donde se almacenaron a 1°C; y 90% HR durante 24 h y posteriormente distribuidos de acuerdo a los tratamiento a estudiar.

La aplicación de las atmósferas ricas en Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) se realizó a través de un generador de ERO's de la marca OXYION® (4005 Series), el cual se basa en hacer pasar una corriente de aire del cuarto refrigerado a través de un tubo donde se somete a un arco eléctrico que provoca la oxidación de parte del oxígeno atmosférico en anión superóxido que en presencia de agua atmosférica generará H₂O₂ y diferentes proporciones de radicales hidroxilo y oxígeno singulete. Las condiciones de operación (tiempo y velocidad de operación) fueron establecidas de acuerdo al volumen de cada una de las cámaras de almacenamiento con las que se cuenta en el laboratorio.

La aplicación de los tratamientos de atmósferas controladas se llevó a cabo en las cámaras de tratamiento CONTROL-TEC® CAM RESEARCH marca TECNIDEX, Fruit Protection, S.A.U. que cuenta con cabinas estancas, con sistemas de control de la temperatura, humedad relativa y concentración de los gases dentro de la cámara (oxígeno, nitrógeno y CO₂).

Se realizó la evaluación del efecto de la exposición a diferentes tiempos de exposición y composición de las atmósferas controladas y atmósferas ricas en especies reactivas de oxígeno sobre el perfil fitoquímico, actividad enzimática, capacidad antioxidante de las zarzamoras, y a la par se evaluó el efecto de las atmósferas sobre el tiempo de almacenamiento de las frutillas mediante un análisis de potencial de almacenamiento.

5.2. Estrategia experimental.

5.2.1. Efecto de los tratamientos de atmósferas con ERO's sobre la calidad y perfil químico y bioquímico de frutos de zarzamora almacenados a 1 y 10 °C.

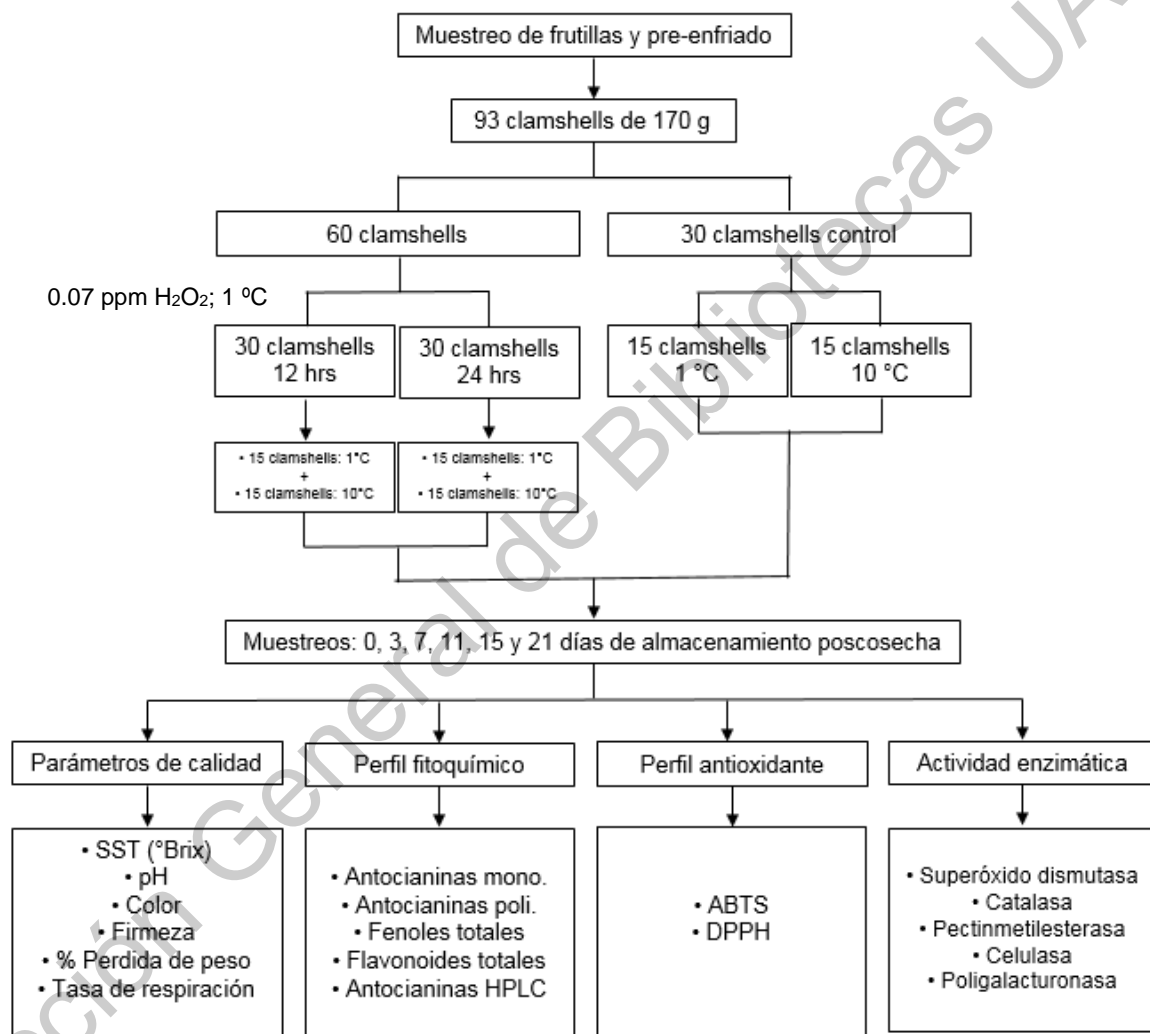


Figura 10. Estrategia experimental para atmósferas con especies reactivas de oxígeno.

Para la aplicación de los tratamientos con ERO's, fueron sometidas a los tratamientos por tiempos de exposición de 12 y 24 horas a 1 °C y después transferidas a cámaras de refrigeración a temperaturas de 1 y 10 °C. A lo largo del almacenamiento poscosecha se realizarán muestreos a los 0, 3, 7, 11, 15 y 21 días.

En cada día de muestreo, de cada tratamiento y réplica se tomaron de los clamshells 5 frutos al azar para determinar acidez titulable, sólidos solubles totales (expresados como °Brix), pH, color y firmeza de las frutillas. Adicionalmente se tomaron 5 frutillas al azar y se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -80 °C para el posterior análisis del contenido de antocianinas monoméricas, antocianinas poliméricas, fenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante, perfil de antocianinas y compuestos fenólicos, además de la determinación de actividad de enzimas del sistema antioxidante (superóxido dismutasa y catalasa) y enzimas de la degradación de la pared celular (poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y celulasa). Adicionalmente en frutos frescos tratados se evaluó la tasa de respiración de cada tratamiento a través del almacenamiento poscosecha.

5.2.2. Efecto de los tratamientos de atmósferas controladas sobre la calidad y perfil químico y bioquímico de frutos de zarzamora almacenados a 1 y 10 °C.

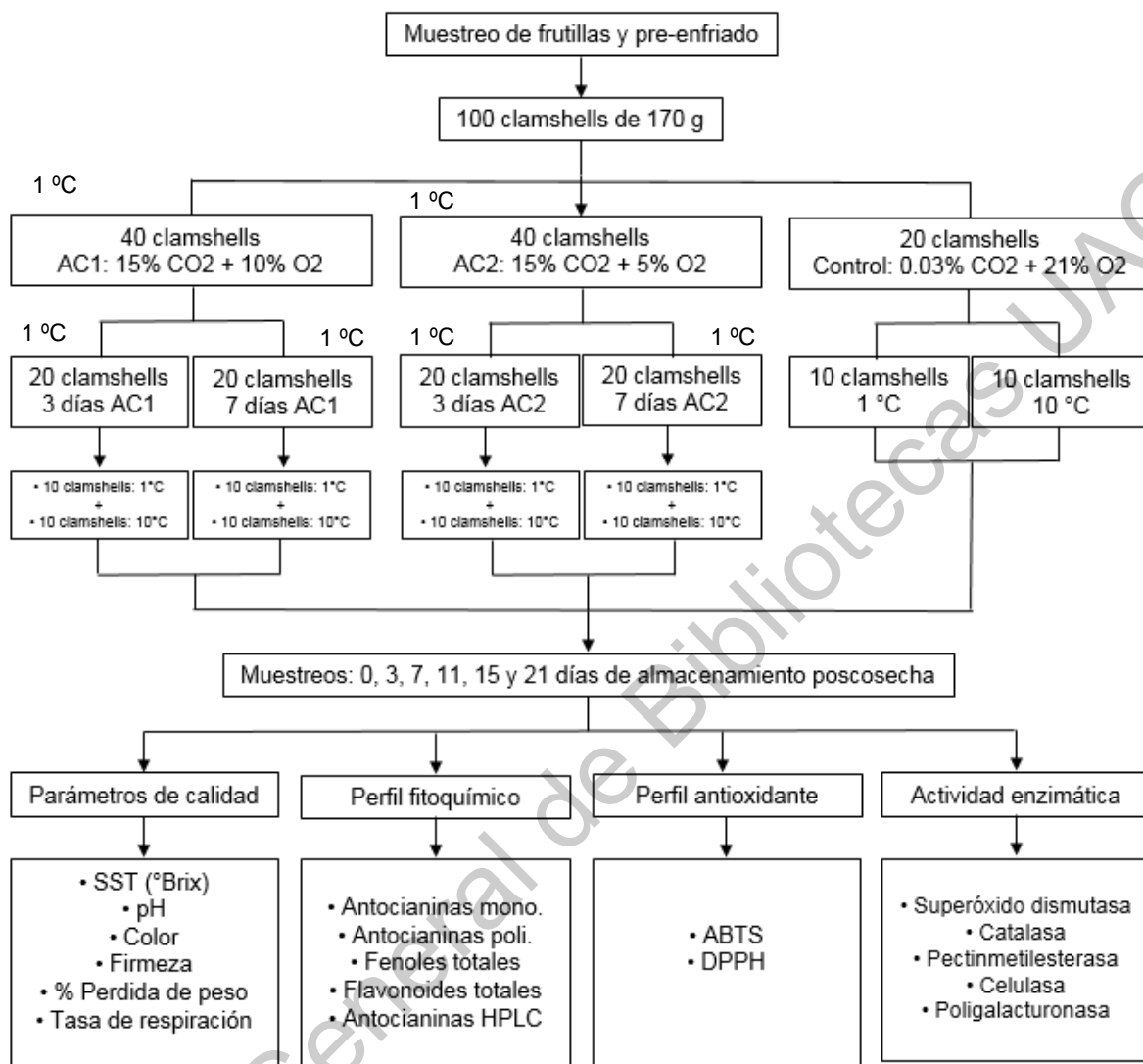


Figura 11. Estrategia experimental para atmósferas controladas.

Para la evaluación de las atmósferas controladas sobre la calidad poscosecha y las características químicas y bioquímicas en frutos de zarzamora durante el almacenamiento poscosecha, se realizó la aplicación de dos diferentes atmósferas controladas (AC1: 15% CO₂ + 10% O₂; AC2: 15% CO₂ + 5% O₂), además de un tratamiento control bajo condiciones atmosféricas estándar (CT: 0.03% CO₂ + 21% O₂) (Figura 11).

Los frutos se sometieron a los tratamientos con atmósferas controladas por 3 y 7 días a 1°C y 90% HR, para posteriormente ser transferidos a cámaras de refrigeración a temperaturas de 1 y 10°C durante 21 días de almacenamiento poscosecha.

A lo largo del almacenamiento poscosecha se realizaron muestreos a los 0, 3, 7, 11, 15 y 21 días y se evaluó el perfil de los parámetros de calidad, químicos y bioquímicos, descritos anteriormente para las atmósferas con ERO's.

5.3. Diseño experimental y análisis estadístico.

5.3.1. Atmósferas con ERO's.

Para los tratamientos con ERO's se realizó un diseño factorial completamente aleatorizado. Como factores a evaluar fueron los muestreos a lo largo del almacenamiento de las frutillas con 6 niveles experimentales (0, 3, 7, 11, 15, y 21 días) y el tiempo de exposición a las ERO's con 2 niveles (12 y 24 horas), teniendo un total de 12 tratamientos con 3 réplicas, dando un total de 36 unidades experimentales, además de un tratamiento control bajo condiciones atmosféricas estándar (aire).

De cada unidad experimental se tomaron al azar 3 frutos y se midieron las siguientes variables de respuesta: sólidos solubles totales (°Bx), porcentaje de pérdida de peso (%PP), acidez titulable (% acidez total), pH, firmeza (N), color (L, a*, C* y h*), tasa de respiración (mL CO₂/Kg*h), contenido de antocianinas monoméricas (mg Cyanidina-3-O-glucósido/100g PF), contenido de antocianinas poliméricas (% de polimerización), contenido de fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/100g PF), contenido de flavonoides (mg equivalentes de catequina/100g PF), perfil de antocianinas, perfil de compuestos fenólicos por HPLC, actividad enzimática de catalasa (unidades de catalasa/g proteína), de superóxido dismutasa (unidades de superóxido dismutasa/g proteína), de poligalacturonasa (mM ácido galacturónico/g proteína), de celulasa (mM glucosa/g proteína) y de pectinmetilesterasa (unidades de pectinmetilesterasa/g proteína) y la

capacidad antioxidante por los métodos ABTS (% inhibición de Trolox) y DPPH (% inhibición de Trolox).

Se realizó un análisis de varianza para evaluar el efecto de los tratamientos sobre cada variable de respuesta evaluada. De igual manera se realizó una comparación de medias múltiple entre los diferentes tratamientos evaluados con el objetivo de encontrar diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de Tukey. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del software estadístico R versión 3.4.1.

5.3.2. Atmósferas controladas.

Para los tratamientos con atmósferas controladas se propuso un diseño trifactorial completamente aleatorizado. Los factores de estudio fueron la composición atmosférica con tres niveles experimentales (AC1: 15% CO₂ + 10% O₂; AC2: 15% CO₂ + 5% O₂; y el tratamiento control en aire (CT)) en aire: el tiempo de exposición con 2 niveles (3 y 7 días de exposición) y el periodo de almacenamiento con 6 niveles (0, 3, 7, 11, 15, y 21 días): teniendo un total de 36 tratamientos con 3 réplicas, dando un total de 108 unidades experimentales.

De cada unidad experimental se tomaron 3 frutillas al azar y se evaluaron las variables de respuesta anteriormente descritas para las atmósferas con ERO's. Se realizó un análisis de varianza para evaluar el efecto de los tratamientos sobre cada variable de respuesta evaluada.

De igual manera, se realizó una comparación de medias múltiple entre los diferentes tratamientos evaluados para identificar diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de Tukey. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del software estadístico R versión 3.4.1.

5.4 Métodos utilizados

5.4.1. Parámetros químicos; Acidez total, sólidos solubles totales (°Brix) y pH.

La determinación de acidez titulable se llevó a cabo empleando la metodología descrita en la (AOAC, 1990) con ciertas modificaciones. 3 frutillas fueron homogenizadas a 10,000 rpm por 1 minuto utilizando un Ultra Turrax (T 25D) y se filtró con manta de cielo recuperando el filtrado. Posteriormente se tomó una alícuota de 1g y se diluyó en 9 mL de agua destilada, se homogenizó y se tituló con NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.2 ± 0.2 .

La acidez titulable se expresó como porcentaje de ácido cítrico en 100 g de muestra utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ acidez} = \frac{\text{Volumen NaOH gastado} * N (\text{NaOH}) * \text{Vol. aforado} * \text{meq ácido cítrico} * 100}{\text{Volumen. muestra} * \text{Peso de la muestra} * 1000}$$

En la misma disolución se midió el pH, usando un potenciómetro (HI 2213 pH/ORP meter, HANNA instruments) y por último se determinó el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) utilizando un refractómetro digital (A. Krüss Optronic GmbH) expresando el resultado como porcentaje de sólidos solubles totales (SST).

5.4.2 Pérdida de peso.

El porcentaje de pérdida de peso se evaluó siguiendo la metodología descrita por Krüger et al., (2011); la cual se determina como la diferencia del peso inicial de los clamshell con la frutilla menos el peso de cada clamshell al final de cada periodo de almacenamiento. La pérdida de peso se expresó como porcentaje de pérdida de peso respecto del peso inicial.

5.4.3. Firmeza.

Para determinar la firmeza de las frutillas se siguió una metodología de compresión propuesta y estandarizada por el grupo de trabajo del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas usando un analizador de textura (Brookfield CT3 25K). Se utilizó una sonda metálica de 36 mm de diámetro, la cual comprimió el 20% del diámetro total de la frutilla sobre su eje ecuatorial a una velocidad de 2.0 mm/seg, una carga de activación de 0.06 N y tiempo de espera de 1 segundo. Los resultados fueron expresados como la fuerza necesaria (N) para comprimir la frutilla 20% del diámetro.

5.4.4. Color objetivo.

Para la determinación de color, se siguió la metodología descrita por Reyes. J., (2005). De cada uno de los 3 frutos muestreados de cada unidad experimental, se registró los parámetros de color en tres puntos equidistantes de la superficie del fruto usando un espectrofotómetro de reflectancia Minolta (Minolta Osaka-Light source D65 CM-600D) utilizando el iluminante A y observador a 10°. Con los valores obtenidos de L^* , a^* y b^* se calculó el cambio de color ΔE , que ha sufrido una muestra respecto a una lectura inicial o tiempo cero. Dicho parámetro se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$\Delta E = \sqrt{(L_2 - L_1)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

Donde ΔE es el cambio total de color que ha sufrido el frutos respecto a una medición inicial (día cero), L , es la luminosidad, a^* denota coloraciones que van de verdes a rojos y b^* denota coloraciones que van de amarillos a azules.

5.4.5. Extracción de compuestos fenólicos.

El extracto para la determinación del perfil fitoquímico y antioxidante de las frutillas se preparó según lo descrito por Ștefănuț et al., (2011). Se homogenizaron 5 g de muestra congelada a -80 °C en 20 mL de solución de extracción (metanol acidificado al 1% con HCl) en una proporción 1:5 (W/V), utilizando un Ultra Turrax (T-25D).

La muestra homogenizada se sonicó por 60 minutos, a una temperatura de 25°C. Posteriormente los extractos fueron filtrados a través de un filtro de papel Whatman no. 1 y el filtrado se sometió a evaporación bajo vacío a una temperatura de 40 °C usando un rotavapor (Büchi R-205) hasta la completa eliminación del solvente. Por último, los extractos fueron re suspendidos en 25 mL de solución de extracción y almacenados a -80 °C hasta su análisis.

5.4.6. Antocianinas monoméricas.

Las antocianinas son moléculas susceptibles a sufrir transformaciones reversibles debido a cambios en el pH de su medio, estas transformaciones se manifiestan por un cambio en la absorbancia y en su curva espectral (Figura 16). Dentro de éstas transformaciones se puede observar que a pH=1 prevalece la forma coloreada (coloraciones rojas) "oxonio" y a pH de 4.5 prevalece la forma incolora "hemiacetal". Por otra parte, a valores de pH básicos (arriba de 7.0) prevalece la forma coloreada "base quinoidal" (coloraciones azules) (Figura 12). El método de cuantificación de antocianinas por pH diferencial se basa en éstas reacciones de transformación de las antocianinas a diferentes valores de pH.

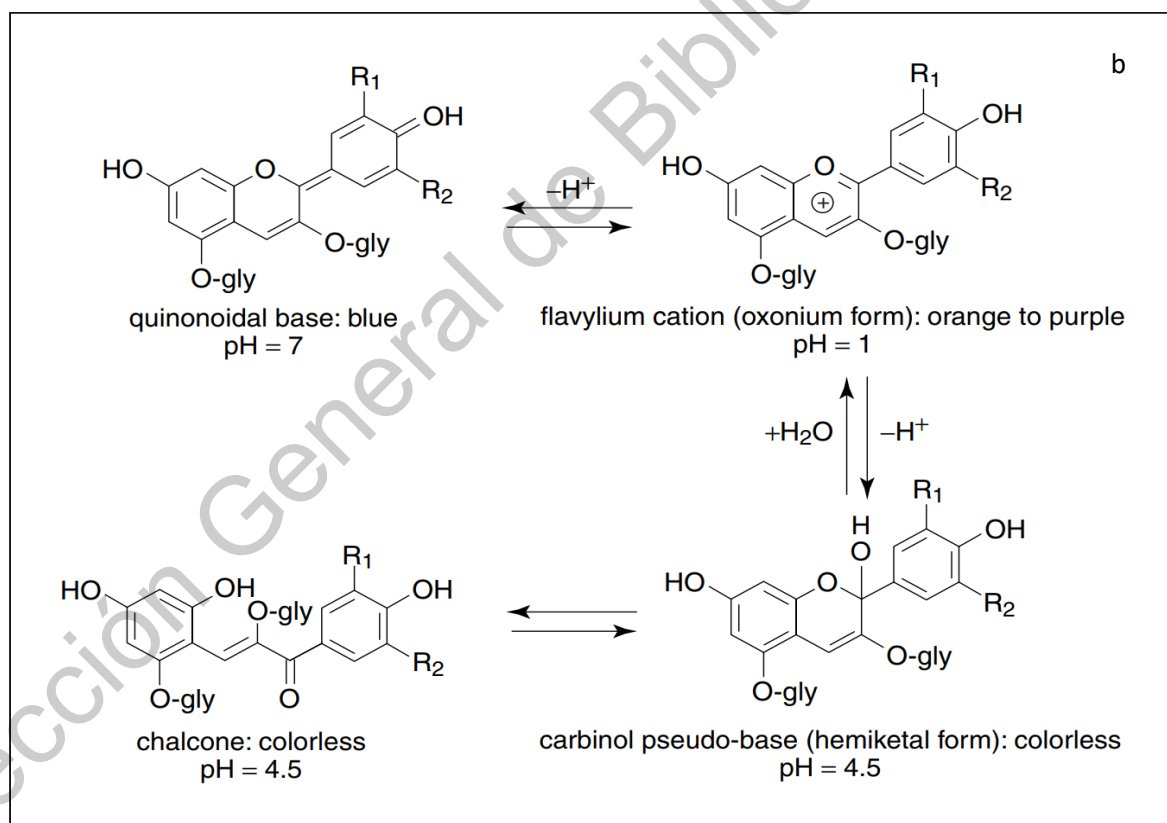
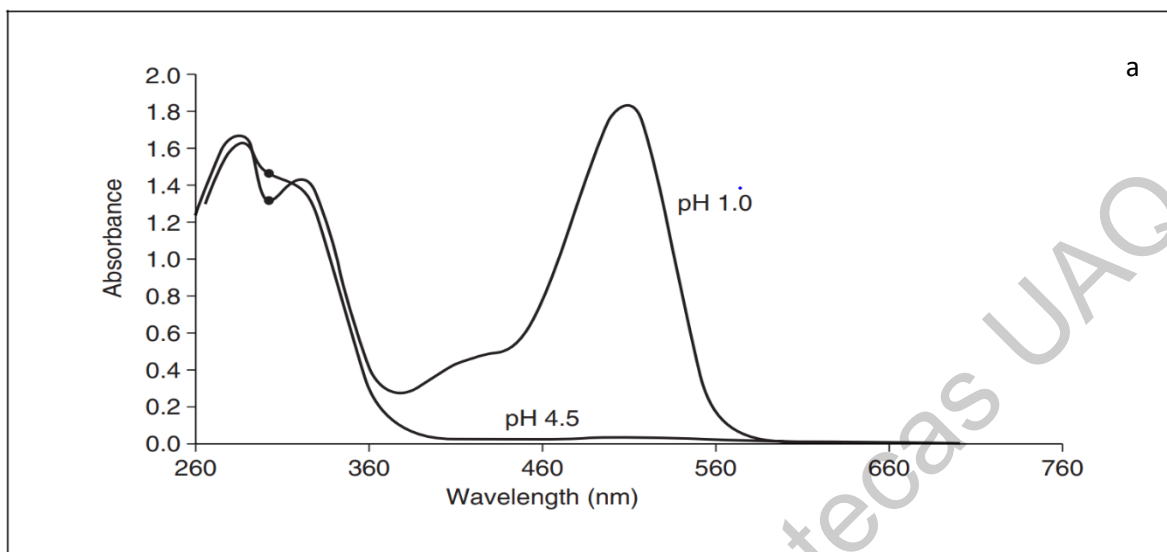


Figura 12. Espectro de absorción de las antocianinas (a); y transformaciones estructurales bajo diferentes valores de pH (b) (Giusti y Wrolstad, 2001).

La cuantificación de antocianinas monoméricas se realizó siguiéndose la técnica de pH diferencial descrita por Giusti y Wrolstad., (2001). Como primer paso se determinó el factor de dilución adecuado al que deberían ser diluidos los extractos para cada muestra, en general el factor de dilución fue 60.

El espectrofotómetro (Perkin Elmer. Mod. Lambda 40) se calibró con agua destilada a las longitudes de 510 y 700 nm. Se prepararon dos diluciones de la muestra, una con buffer de cloruro de potasio (pH 1.0) y la otra con buffer de acetato de sodio (pH de 4.5), se incubaron por 15 minutos protegidas de la luz. Una vez equilibradas las muestras se leyó la absorbancia a 510 y a 700 nm contra el blanco (agua destilada). La absorbancia de la muestra diluida (A) se calculó con la siguiente fórmula:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

Una vez calculada la absorbancia de la muestra diluida, se calculó la concentración del pigmento monomérico en la muestra original usando la siguiente expresión:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/litro)} = (A \cdot \text{MW} \cdot \text{DF} \cdot 1000) / (E \cdot 1)$$

donde MW es el peso molecular (577) de la cianidín 3 glucósido, DF es el factor de dilución (DF=60) y E es el coeficiente de extinción molar (26,000) de la antocianina. Los resultados se expresaron como mg de cianidina-3-O-glucósido/100g PF.

5.4.7. Antocianinas poliméricas

La cuantificación de antocianinas poliméricas se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Giusti y Wrolstad, (2001). El índice de degradación de las antocianinas se puede estimar mediante su tratamiento con bisulfito de sodio. Mediante tal tratamiento las antocianinas son capaces de combinarse con el bisulfito para formar aducto de ácido sulfónico, el cual es incoloro (Figura 13).

Los complejos polimerizados antocianinas-tanino, etc, son resistentes a éste blanqueamiento por el bisulfito, por lo que solamente las antocianinas monoméricas formarán aducto de ácido sulfónico. La absorbancia presentada por los complejos bisulfito-antocianina a una longitud de onda de 420 nm sirve para determinar el índice de pardeamiento. La densidad de color es definida como la suma de las absorbancias a la λ_{vis-mx} y a 420 nm. La relación entre el color polimerizado y la densidad de color es usada para determinar el porcentaje de color que es atribuido por las antocianinas polimerizadas.

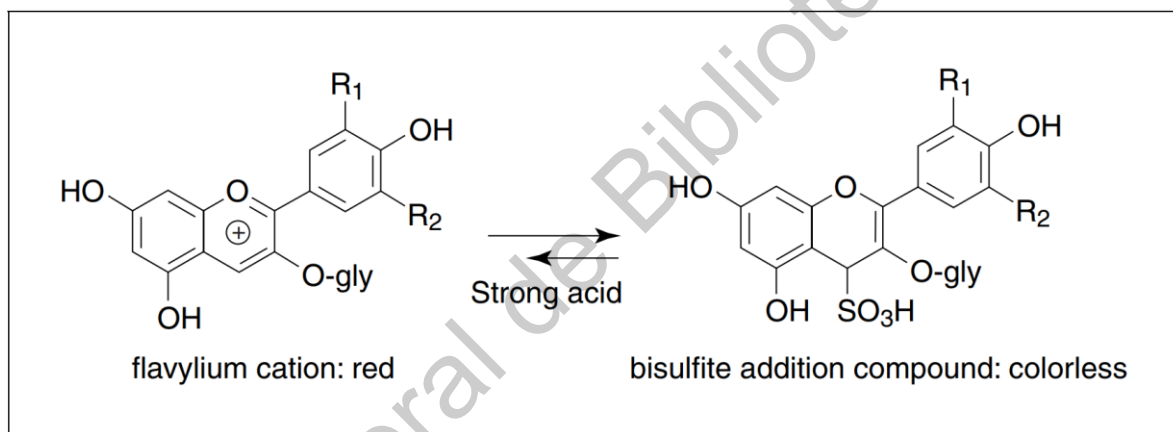


Figura 13. Blanqueamiento de antocianinas por metabisulfito de sodio (Giusti y Wrolstad, 2001).

Como primer paso se determinó el factor de dilución adecuado para las muestras de trabajo, diluyendo la muestra con el buffer de cloruro de potasio 0.025 M (pH 1.0) hasta obtener una absorbancia menor a 1.2. Posteriormente se blanqueó la señal del espectrofotómetro (Perkin Elmer. Mod. Lambda 40) con agua destilada a longitudes de onda de 420, 510 y 700 nm.

Posteriormente, se diluyó la muestra con agua destilada según el factor de dilución (FD) previamente establecido y a dos celdas se transfirieron 2.9 mL de la muestra diluida, seguido a esto, a una de las celdas se agregaron 0.1 mL de agua

destilada y a la otra se le agregó 0.1 mL de metabisulfito de sodio (0.2g/mL); se incubaron por 15 minutos protegidas de la luz.

Posteriormente, se midió la absorbancia de las dos muestras a longitudes de onda de 420, 510 y 700 nm, en contraste con el blanco (agua destilada).

Se calculó la densidad de color de la muestra utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Densidad de color} = ((A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})) \cdot \text{FD}$$

El color polimérico de las antocianinas se calculó con la muestra blanqueada con metabisulfito de sodio utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Color polimérico} = ((A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})) \cdot \text{FD}$$

Por último se calculó el porcentaje de color polimérico con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de color polimérico} = (\text{Color polimérico} / \text{densidad de color}) \times 100.$$

5.4.7 Fenoles totales.

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Singleton y Rossi., (1965) y expresados como mg equivalentes de ácido gálico/100g peso fresco. La metodología se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu bajo condiciones de pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible a ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm.

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico formando un compuesto llamado ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido) de coloración amarilla, que al ser reducido por los grupos fenólico en medio básico da lugar a un complejo de color azul intenso (Figura 14).

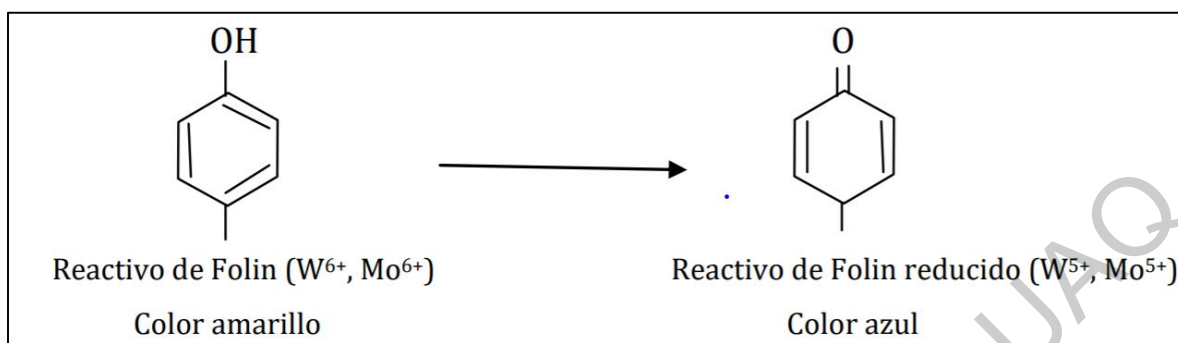


Figura 14. Reacción de ácido fenólico con reactivo de Folin.

El extracto original se diluyó con el solvente de extracción en una relación 1:8; 7 μL del extracto diluido en cada pozo se llevaron a un volumen de 50 μL con agua destilada, seguidos de la adición de 25 μL de reactivo de Folin Ciocalteu (1N), se dejó reposar por 5 minutos protegidos de la luz. Pasados los 5 minutos se adicionaron a cada pozo 125 μL de solución de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 20% (debe ser preparado con agua grado HPLC) y se dejó reposar por 30 minutos protegidos de la luz. Después se midió la absorbancia a 765 nm en un lector de microplacas (iMark™ Microplate Reader, BIO-RAD). Los cálculos se llevaron a cabo mediante el uso de una curva de calibración de ácido gálico.

5.4.8 Flavonoides totales.

La cuantificación de flavonoides totales se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Robertson y Hall., (1989). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina (ECAT)/100g peso fresco.

La cuantificación se basa en la formación del complejo flavonoide-cloruro de aluminio, el cual absorbe a una longitud de onda de 510 nm (Figura 15).

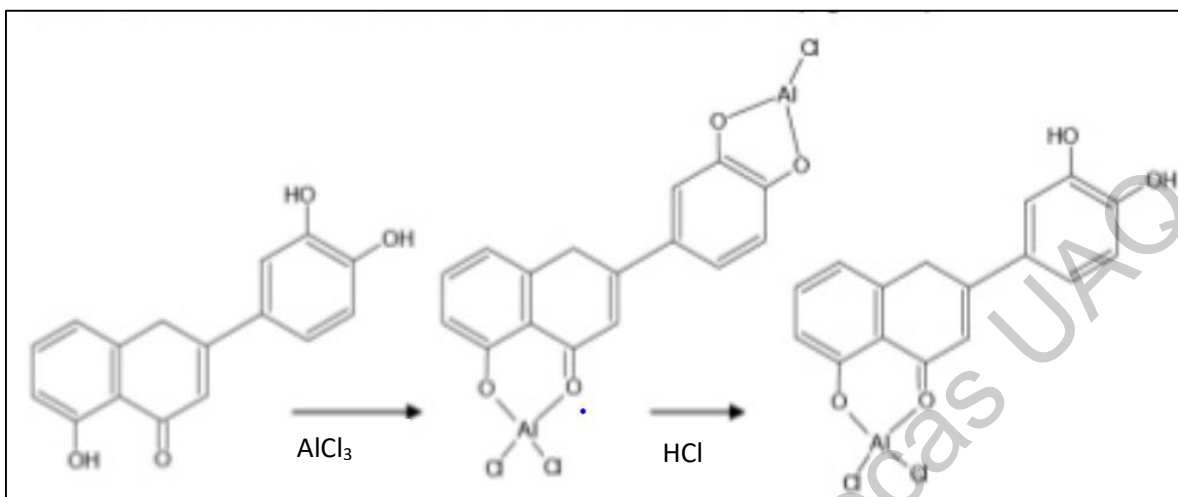


Figura 15. Formación del complejo flavonoide.

Se diluyó el extracto original con el solvente de extracción en una relación 1:5 del cual se tomaron 4 μL del extracto y se introdujeron dentro de los pozos de una microplaca, seguido de esto, a cada pozo se añadieron 125 μL de agua destilada, enseguida se añadieron 7.5 μL de nitrato de sodio al 5% (NaNO_2 al 5%) y la mezcla de reacción se incubó 6 minutos protegidos de la luz. Después se añadieron 15.0 μL de cloruro de aluminio al 10%, se dejó incubar por 5 minutos en ausencia de la luz, enseguida se añadió a cada pozo 50 μL de hidróxido de sodio 1 M (NaOH 1 M) y por último se añadieron 52.5 μL de agua destilada y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas (iMark™ Microplate Reader, BIO-RAD) a una longitud de onda de 510 nm. Los cálculos se llevaron a cabo mediante el uso de una curva de calibración de catequina.

5.9. Capacidad antioxidante ABTS.

Para la determinación de la capacidad antioxidante se siguió la metodología descrita por R. Re., (1999).

La técnica se basa en la generación del radical ABTS^{\bullet} por la oxidación del ABTS^{\bullet} . Esta oxidación puede generarse de forma enzimática o química (dióxido de manganeso, persulfato potásico, radicales peroxilo).

El radical obtenido es un compuesto de color verde-azulado estable con una absorción máxima a 734 nm (Figura 16).

Durante la reacción se procede a monitorear la reducción del radical $ABTS^{\bullet}$ causada por la adición de una muestra que contiene antioxidantes. La absorbancia se compara con la del trolox.

A 20 μ L de extracto metanólico previamente diluido en una relación de 1:6 dentro de los pozos de la microplaca, se les agregaron 230 μ L de solución de ABTS y se incubaron por 6 minutos y la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm fue leída. Los resultados de la capacidad antioxidante se expresaron como porcentaje de inhibición de Trolox. Los cálculos se llevaron a cabo mediante el uso de una curva de calibración de Trolox.

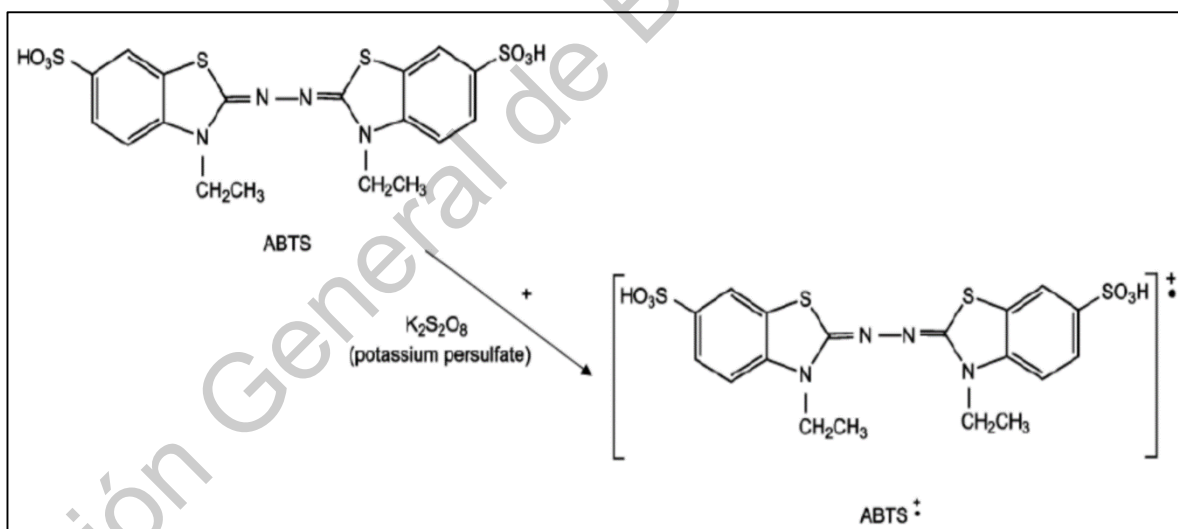


Figura 16. Oxidación del radical ABTS.

5.10. Capacidad antioxidante DPPH.

Este método fue propuesto por Blois, (1958) en el cual demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno (H) proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres.

La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 17, el color violeta se desvanece (Figura 17).

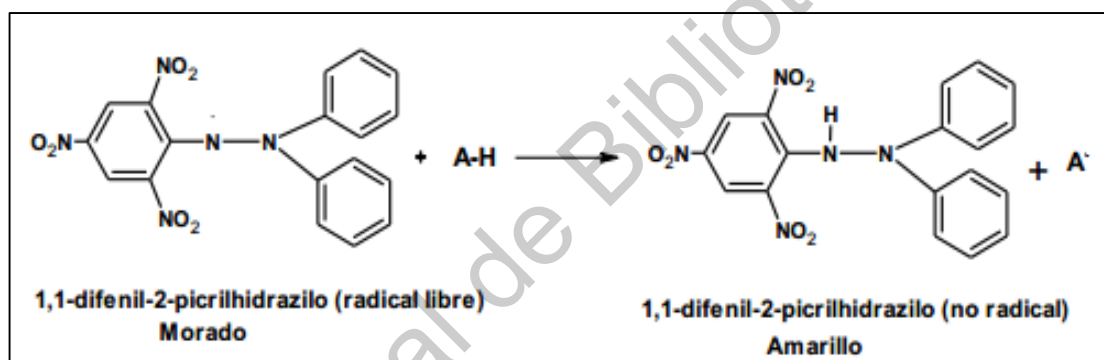


Figura 17. Reducción del radical DPPH.

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH, se siguió la metodología descrita por Brand et al., (1995). Se adicionaron 20 μ L del extracto metanólico previamente diluido en una relación de 1:6 dentro de los pozos de la microplaca, se le agregaron 200 μ L de solución de DPPH, se incubó por 6 minutos y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Los resultados de la capacidad antioxidante se expresaron como porcentaje de inhibición de trolox. Los cálculos se realizaron mediante el uso de una curva de calibración de Trolox.

5.11. Determinación de actividad de enzimas del sistema antioxidante.

5.11.1. Preparación de polvos de acetona.

Se tomaron 85 g de muestra almacenada a -80 °C y se homogenizaron con 340 mL de acetona a -20 °C con el uso de un Ultra Turrax (T-25D) a 20,000 rpm por 1 minuto y se dejó reposar por 15 minutos. Se filtró con papel Whatman No. 1 y bomba de vacío.

Se recuperó el residuo del filtrado, se resuspendió en 340 mL de acetona a -20 °C y se homogenizaron con el uso de un Ultra Turrax (T-25D) a 20,000 rpm por 1 minuto y se dejó reposar por 15 minutos. Se filtró con papel Whatman No. 1 y bomba de vacío. Se realizaron dos lavados más, realizándose un total de 4 lavados, recuperando la torta de filtración en el cuarto lavado y dejándose secar durante 12 horas en campana de extracción. El polvo final se pesó y se almacenó en bolsas herméticamente selladas.

5.11.2. Preparación del extracto enzimático crudo.

Para la preparación del extracto crudo enzimático se siguió la metodología descrita por Dhindsa et al., (1981). Se pesaron 0.5 g del polvo de acetona de cada tratamiento, los cuales se homogeneizaron en 15 mL de solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M de fosfato de sodio (pH 7.0) y 10 mM de EDTA) y 1% de PVP (polivinilpirrolidona) a 10,000 rpm por 1 minuto con un homogenizador (Ultra Turrax (T-25D)). El homogenizado obtenido se centrifugó a una velocidad de 15 000 g, por 10 minutos y 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C para su posterior análisis de actividad enzimática.

5.11.3. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD).

La determinación de superóxido dismutasa se realizó siguiendo la metodología descrita por Tejacal et al., (2005). Se preparó una mezcla de 2.7 mL de buffer de fosfato de sodio (0.05 M; 0.1 mM EDTA; pH=7.8) con 150 μ L de metionina (30 mg/mL), 100 μ L de NBT (1.4 mg/mL) y 40 μ L del extracto crudo enzimático. A la mezcla se añadieron 120 μ L de solución de riboflavina (4.4 mg/100 mL) para iniciar la reacción. La mezcla resultante se agitó y se expuso a luz fluorescente con lámparas de 20 W por 30 minutos. Por último se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elmer. Mod. Lambda 40) a 560 nm. La actividad enzimática fue expresada como unidades de superóxido dismutasa (USOD)/mg proteína, donde una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en 50% la formación de NBT- diformazan.

5.11.4. Actividad enzimática de catalasa (CAT).

La actividad enzimática de catalasa se determinó siguiendo la metodología descrita por Wu et al., (2016). Se mezclaron 2.6 mL buffer de fosfatos 50 mM (pH = 7.8) con 0.5 mL del extracto crudo anteriormente descrito. A la mezcla se le añadieron 3.5 μ L de Peróxido de Hidrógeno al 30% (H₂O₂ 30%). La tasa de la disminución de la absorbancia a 240 nm (lector de microplacas (Bio-Rad iMark)) fue medida cada 30 segundos durante 5 minutos. El cambio de la absorbancia en una magnitud de 0.01 por minuto se define como una unidad de actividad de la enzima.

5.12. Determinación de actividad de enzimas de degradación de la pared celular.

5.12.1. Preparación del extracto crudo enzimático.

Se preparó el extracto crudo enzimático con base a en metodología descrita por (Andrews et al., 1995). A 500 mg del polvo de acetona de cada uno de los tratamientos evaluados se añadió 15 mL de buffer de extracción (40 mM de acetato de sodio (pH=5.2), 100 mM NaCl, 2% (v/v) 2-mercaptoetanol y 5% (p/v) de PVP) y se dejó reposar por 15 minutos a 2 °C.

La mezcla se centrifugó a 20,000 g por 20 minutos a 2 °C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

5.12.2. Actividad de poligalacturonasa.

La actividad de poligalacturonasa se midió de acuerdo a lo descrito por Deng et al., (2005). Se mezclaron 2 mL de buffer de acetato de sodio (0.2 M; pH=5.0) con 1 mL de extracto crudo enzimático. Posteriormente se adicionaron 1 mL de solución de pectina (1% p/v) y se incubó la mezcla de reacción por 1 hora a 37 °C. 300 µL de la mezcla de reacción se mezcló con 300 µL de reactivo de DNS y se sometió a baño con agua en ebullición por 10 minutos. Se detuvo la reacción con el DNS en un baño con agua a 1 °C y se leyó la absorbancia a 540 nm. La actividad se reportó como mg ácido galacturónico/g proteína*h.

5.12.3. Actividad de celulasa.

La actividad de celulasa se evaluó de acuerdo a la metodología descrita por Deng et al., (2005). Un volumen de 1000 µL de buffer de acetato de sodio (0.1 M; pH=5.0) se mezclaron con 200 µL del extracto crudo enzimático y 800 µL de solución de carboximetil celulosa (1% p/v), se incubó por 1 hora a 37 °C. 300 µL de la mezcla de reacción se mezclaron con 1,200 µL de reactivo de DNS. La mezcla se sometió a baño de agua en ebullición por 10 minutos y se detuvo la reacción con agua a 1 °C. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 540 nm. La actividad enzimática se expresó como mg glucosa/g proteína*h.

5.12.4. Actividad de pectinmetilesterasa.

La actividad de pectinmetilesterasa se midió mediante la metodología propuesta por Andrews et al., (1995). Un volumen de 10 mL de solución de pectina (1% p/v), se ajustaron a pH 7.5 con NaOH 1N, a 37 °C; se añadió 1 mL de extracto crudo enzimático, se incubó por 1 hora a 37 °C. La reacción se detuvo colocando la mezcla en un baño de agua fría a 1 °C. Posteriormente se midió el pH final de la mezcla de reacción y se reajustó a un pH de 7.5 con NaOH 0.01 N.

Se calculó la actividad enzimática como unidades de pectinmetilesterasa (UPME)/g. La unidad de pectinmetilesterasa se define como la cantidad de enzima que libera un micro equivalente de grupos carboxilo a pH de 7.5, por minuto, a 37 °C.

$$UPME = \frac{N * V * 1000}{A * t}$$

Donde N, es la normalidad de NaOH utilizado (0.01 N); V, son los mL de NaOH gastado; A, es el volumen del extracto crudo enzimático utilizado y t, es el tiempo de reacción en minutos (60 min).

5.12.5 Determinación del contenido de proteína total.

El contenido de proteína total se estimó de acuerdo a lo descrito por Bradford., (1976) siguiendo las instrucciones del reactivo de Bradford de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Un volumen de 30 µL del extracto crudo enzimático se mezcló con 250 µL del reactivo de Bradford. La mezcla se agitó por 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (iMark™. Bio-rad Laboratories Inc., Germany). Los cálculos se llevaron a cabo mediante el uso de una curva de calibración de albumina bobina a 595 nm.

5.13. Análisis del perfil de antocianinas por HPLC-DAD.

El análisis del perfil de antocianinas se realizó siguiendo la metodología propuesta y estandarizada por el equipo de trabajo del laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas.

Los compuestos se separaron utilizando un sistema HPLC (Water Alliance 2695 con detector de arreglo de diodos Water 2998). Para la integración de picos se recurrió al software Empower 3 de la marca Waters.

Se usó una columna Simmetry C18 fase reversa (100 x 4.6mm) como fase estacionaria y una fase móvil de: solvente A (agua acidificada con ácido fórmico al 0.1%) y solvente B (acetonitrilo grado HPLC). La elución se llevó a cabo con las condiciones descritas en la Tabla 9. Se utilizó un flujo de 0.5 mL/min y se inyectaron 30 µl del extracto fenólico concentrado previamente diluido en una relación 1:12 y filtrado mediante un filtro de jeringa de 0.4 µm de diámetro de poro.

La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C y la muestra a 8°C, durante todo el análisis los compuestos fenólicos se identificarán comparando los tiempos de retención y los espectros UV-Visible con datos reportados previamente en la literatura.

Tabla 9. Gradiente utilizado para la separación de antocianinas en una columna C18 fase reversa.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	98	2
40	80	20
50	0	100
55	98	2
60	98	2

6.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Efecto de las atmósferas controladas en los parámetros evaluados a 1 y a 10 °C.

6.1.1. Efecto de los tratamientos de atmósferas controladas sobre la calidad y vida de anaquel de los frutos; sólidos Solubles Totales y Acidez Total.

En los frutos almacenados a 1 °C los factores individuales que ejercieron un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) sobre dicho parámetro fueron los días de almacenamiento poscosecha y el tiempo de exposición (3 y 7 días) en las dos composiciones de atmósferas controladas evaluadas (AC1: 15% CO₂ + 10% O₂; AC2: 15% CO₂ + 5% O₂). De igual manera, se observó un efecto significativo producto de la interacción doble entre los días de almacenamiento poscosecha (0, 3, 7, 11, 15, 21 días) y el tiempo de exposición (3 y 7 días). Como se puede observar en la Figura 18, existió un incremento significativo en el contenido de sólidos solubles totales a través del almacenamiento poscosecha, como era de esperarse, debido a la propia naturaleza senescente de las frutillas. De igual manera, se puede observar que el incremento en el contenido de sólidos soluble totales a través del almacenamiento poscosecha se disminuyó de manera significativa en las frutillas sometidas a 3 y 7 días respectivamente respecto a lo obtenido en el tratamiento control (10.20, 10.60 y 11.6 ± 0.11) hasta los 21 días de almacenamiento poscosecha. Por otra parte, se observaron diferencias estadísticamente significativas por la composición de las atmósferas controladas respecto al control; sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre las dos composiciones de atmósferas controladas, es decir, ambas composiciones atmosféricas redujeron de manera significativa el metabolismo del fruto, y como consecuencia, se redujo la cantidad de sólidos solubles totales. Ésta reducción en la velocidad metabólica se traduce directamente en un mayor mantenimiento de las características de calidad deseables en los frutos de zarzamoras hasta los 21 días de almacenamiento poscosecha, es decir, mayor vida de anaquel.

Para los resultados obtenidos en la evaluación de los tratamientos a una temperatura de 10 °C se observó el mismo comportamiento sobre dicha variable de respuesta (Tabla 10).

Para efecto de comparación, se realizó la comparación estadística de medias de los resultados obtenidos a ambas temperaturas, obteniendo un contenido de sólidos solubles totales significativamente mayor en frutos almacenados a 1 °C (10.92) respecto a lo obtenido en los frutos almacenados a 10 °C (10.62) durante 15 días de almacenamiento poscosecha.

Por otro lado, respecto a lo obtenido para los parámetros de pH y acidez total, se puede observar que en los tratamientos evaluados tanto para 1 y 10 °C hay un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los factores individuales; tiempo de almacenamiento y tiempo de exposición a las atmósferas controladas, respecto a lo obtenido en el tratamiento control. Además, de los resultados obtenidos de los tratamientos evaluados 10 °C se observó un efecto altamente significativo de la composición de las atmósferas controladas evaluadas, obteniéndose mayores valores de pH en la composición atmosférica 2 (AC2) respecto a la atmósfera controlada 1 (AC1) con valores de 3.03 y 2.97 respectivamente (Figura 19). En la Figura 19, se puede observar una disminución estadísticamente significativa del pH por efecto del tiempo de exposición de las frutillas a las atmósferas controladas (7 y 3 días) respecto al tratamiento control con valores de 2.76, 2.84 y 2.82 respectivamente. Se puede observar que a 7 días de exposición a las atmósferas controladas, principalmente se logra reducir éste valor, tal y como pasó con lo obtenido para los sólidos solubles totales. Esta disminución en el valor del pH puede ser parcialmente explicada y correlacionada con la disminución en el contenido de sólidos solubles totales, debido a que se ha reportado que al cuantificar el contenido de dicho parámetro, de igual manera se está cuantificando cierta cantidad de ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, sales orgánicas e inorgánicas y aminoácidos (Morín., 1980). Por otra parte, a través de los resultados obtenidos para el porcentaje de acidez total en los tratamientos evaluados a una temperatura de 1 °C, como se

puede observar en la Figura 20, no se observa un efecto claro por parte de los factores individuales como con sus interacciones tanto para los tratamientos evaluados a 1 °C y a 10 °C (Tabla 10). Por último, se observaron diferencias estadísticas significativas del factor temperatura, obteniendo un valor de pH igual a 2.80 y 3.00 en frutos almacenados a 1 y 10 °C, respectivamente. De igual manera para el parámetro de acidez total, se observaron diferencias estadísticas significativas, obteniendo valores de acidez de 0.91 y 1.33% para frutos almacenados a 1 y 10 °C, respectivamente.

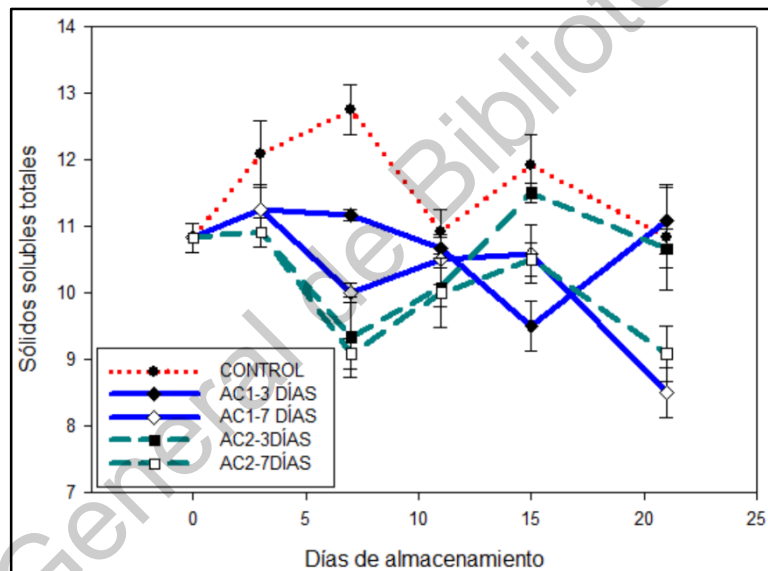


Figura 18. Cambios de los sólidos solubles totales en frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas: control en aire, AC1 y AC2: (15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂) por 3 y 7 días, almacenados 21 días a 1 °C.

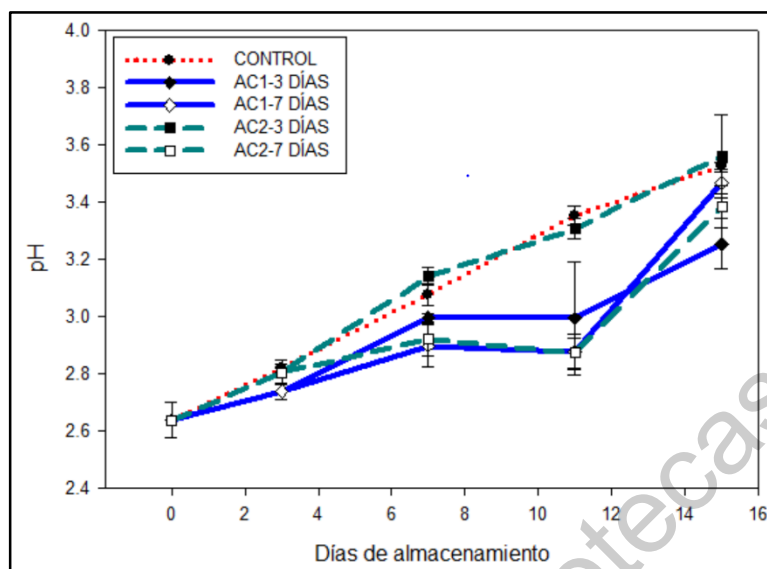


Figura 19. Cambios en el pH de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas controladas: AC1 y AC2: (15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂) por 3 y 7 días por 15 días de almacenamiento a 10 °C.

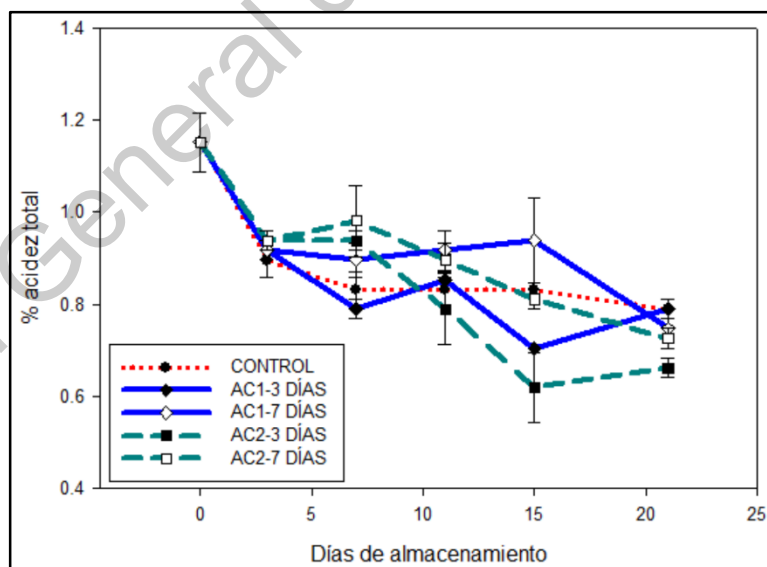


Figura 20. Cambios en el porcentaje de acidez total en frutos de zarzamora almacenados en atmósferas controladas: AC1 y AC2: (15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂) por 3 y 7 días durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

Tabla 10. Comparación de medias de de SST, AT y pH en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas controladas AC1 y AC2: (15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂) por 3 y 7 días y frutos control en aire y almacenados a 1 y 10 °C por 21 y 15 días, respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Sólidos solubles totales		Acidez (%)		pH	
1 °C	Control	11.60	a	0.88	ab	2.82	a
	3 días	10.60	b	0.88	b	2.84	a
	7 días	10.20	b	0.92	a	2.76	b
10 °C	Control	11.40	a	0.86	a	3.08	a
	3 días	10.00	c	0.83	a	3.00	ab
	7 días	10.45	b	0.85	a	2.92	b

El contenido de sólidos solubles totales tiene un alto impacto en las características organolépticas de las frutillas, y afecta la aceptabilidad de los consumidores. Desde el punto de vista organoléptico, el consumo de zarzamoras se favorece en frutos con un alto contenido de sólidos solubles totales.

Desde el punto de vista fisiológico, los carbohidratos son el sustrato para el desarrollo de la función respiratoria y la alimentación de diferentes rutas metabólicas. Dada la característica no climatérica de los frutos de zarzamora, se espera que los azúcares disminuyan conforme transcurre el almacenamiento. Los cambios de los SST en los frutos control mostraron un incremento de estos durante los primeros 7 días y un posterior decremento hasta el final del almacenamiento. Este comportamiento no ha sido reportado previamente pues esos trabajos solo señalan el contenido al final de los periodos de almacenamiento (Perkins-Veazie et al., 2002). No obstante, ese mismo grupo de trabajo reportó un incremento de los sólidos solubles y de azúcares durante el cambio de color del negro brillante al negro mate (Perkins-Veazie et al., 2000). También estos autores señalaron que la producción de etileno, así como la actividad de enzimas asociadas a su síntesis, fue notablemente mayor en el receptáculo en comparación con las drupeolas.

Este hecho parece señalar que el receptáculo puede estar controlando parte de los procesos metabólicos que ocurren en las drupeolas. Uno de estos procesos puede ser que componentes de la pared celular del receptáculo sean hidrolizados y transportados a las drupeolas induciendo el incremento de los sólidos solubles registrado.

La aplicación de las AC2 por 3 días tuvo un efecto inhibitorio del proceso descrito; no obstante, después de ser liberados a condiciones de aire, las muestras tuvieron capacidad de alcanzar niveles de SST similares a los frutos control.

La Figura 18, señala una significativa reducción en el contenido de sólidos solubles totales en los frutos sometidos a 7 días en ambas composiciones de AC evaluadas. Esta reducción en dicho parámetro indica un cambio en el metabolismo celular y por consecuencia un cambio en la vida de anaquel de los frutos.

La medición de sólidos solubles totales se da principalmente por diversos carbohidratos como la sacarosa y azúcares simples como la glucosa y la fructosa, además de otros compuestos como ácidos orgánicos. En el metabolismo anabólico y catabólico, la sacarosa es el principal carbohidrato para la obtención de energía. En la zarzamora intervienen diversas enzimas de síntesis y degradación como la sacarosa fosfato sintasa, la sacarosa sintasa y la sacarosa invertasa principalmente, y estas enzimas son significativamente afectadas por las bajas concentraciones de oxígeno y las altas concentraciones de dióxido de carbono.

Los estudios de efectos de AC en el metabolismo de azúcares en zarzamora son muy escasos, Perkins et al., (2002) reportaron la reducción de manera significativa del contenido de sólidos solubles totales en zarzamoras de la variedad "Navaho" sometidas a atmósferas controladas con una composición de 10%O₂ + 15% CO₂. Brackmann et al., (2016) evaluaron el efecto de 3 distintas AC (5% O₂ + 15% CO₂, 5% O₂ + 10% CO₂ y 10% O₂ + 10% CO₂) en la calidad de zarzamora cv "Guarani" de Brasil, durante 12 días.

A pesar del largo tiempo de exposición a los tratamientos, dichos autores solo encontraron una reducción significativa en la cantidad de sólidos solubles totales en atmósferas de 10%O₂ + 10%CO₂. De igual manera reportaron un incremento en el porcentaje de frutos sanos al final del tratamiento de AC.

De igual forma, también se han observado estos resultados en otras especies de frutas; Bodelón et al., (2010) evaluaron la exposición a atmósferas con 20% de CO₂ por 3 días en fresas en el contenido de fructosa, glucosa, sacarosa, además de los sólidos solubles totales y la acidez total, observando también una reducción significativa en los contenidos de fructosa, glucosa y sacarosa.

De igual manera, Imlak et al., (2017) a través de la implementación de 3 composiciones de atmósferas controladas (con 3, 5 y 10% CO₂) en uvas donde observaron también una disminución en el contenido de sólidos solubles totales a medida que se incrementó la concentración de CO₂.

Además del efecto positivo de las altas concentraciones de CO₂ sobre la actividad de enzimas del metabolismo de la sacarosa disminuyendo la tasa metabólica, se tienen registros de un efecto significativo sobre la acumulación de succinato, disminución del pH y ATP intracelular, pero principalmente sobre el metabolismo fermentativo de las frutillas, inhibiendo y estimulando la actividad de diversas enzimas como la alcohol deshidrogenasa, lactado deshidrogenasa, piruvato descarboxilasa y piruvato deshidrogenasa principalmente.

A través de la inactivación de la piruvato deshidrogenasa, debido a la baja concentración de O₂, se logra detener el flujo de la glucólisis hacia el ciclo de Krebs, lo cual es de gran importancia ya que se logra disminuir de manera significativa el metabolismo celular, disminuyendo la cantidad de sólidos solubles totales. Sin embargo, el metabolismo celular no está del todo bloqueado, se siguen consumiendo los sustratos y produciendo energía a través del paso del piruvato hacia la generación de productos de fermentación, esto gracias a la ayuda de

enzimas no dependientes de oxígeno como la piruvato descarboxilasa, la alcohol deshidrogenasa y la lactato deshidrogenasa (Figura 21).

Todo lo anterior conlleva de igual manera a un incremento de ácidos orgánicos y una disminución del pH intracelular, lo cual explicaría de manera certera la disminución en los valores de pH obtenidos en los tratamientos con atmósferas controladas, y desde luego la disminución de los sólidos solubles totales.

Ke et al., (1995) al evaluar los efectos de AC de altas concentraciones de CO₂ y bajas concentraciones de O₂ sobre el metabolismo fermentativo en aguacates (*Persea americana*). Dichos autores evaluaron la actividad de enzimas como alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, piruvato descarboxilasa y piruvato deshidrogenasa, así como los niveles de NAD⁺ y NADH en 3 diferentes condiciones atmosféricas: 0.25% O₂ (el resto nitrógeno), 0.25% O₂ + 80% CO₂ y condiciones atmosféricas estándar. Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa en la actividad de la piruvato deshidrogenasa y por consecuencia una aumento en la actividad de la alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa en frutos sometidos a las condiciones de atmósferas controladas. De igual manera se registró un incremento en el contenido de NAD⁺. Los mecanismos anteriormente descritos pueden ser visualizados en la Figura 21.

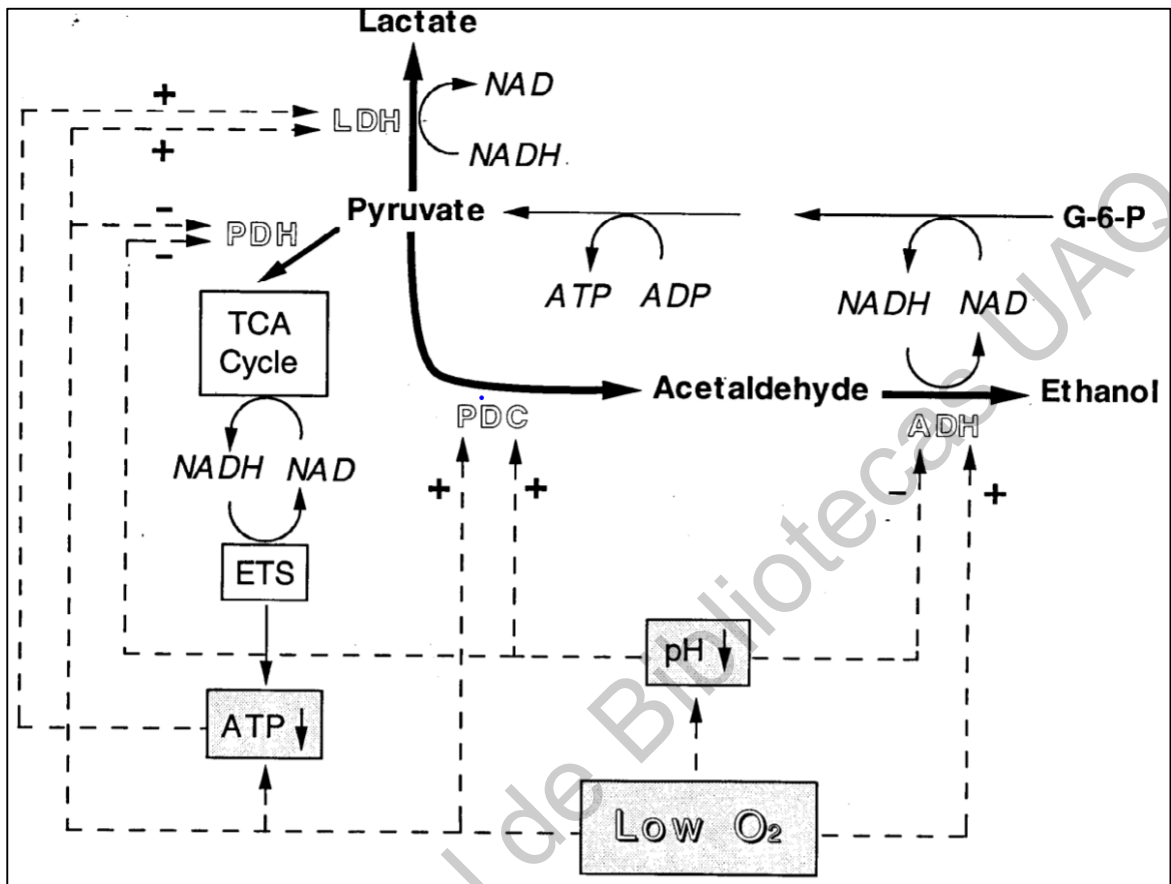


Figura 21. Metabolismo fermentativo bajo condiciones de baja concentración de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono.

6.1.2. Efecto de las atmósferas controladas en la pérdida de peso.

A través de los resultados obtenidos de los tratamientos evaluados a una temperatura de $1\text{ }^\circ\text{C}$ sobre la pérdida de peso, se puede observar que el porcentaje de pérdida de peso fue afectado de manera significativa ($p \leq 0.05$) por los factores individuales como los días de almacenamiento poscosecha, donde se puede observar que se alcanzó un porcentaje de pérdida de peso promedio de 10.38% al día 15 de almacenamiento, respecto al peso inicial de los frutos al día cero (Figura 22).

Así mismo, se puede observar un significativo incremento en la pérdida de peso ($p \leq 0.05$) al día 21 de almacenamiento comparado con el día 15, en los cuales se obtuvieron valores de 14.17 y 10.38% respectivamente.

Por otra parte, se puede observar un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) del tiempo de exposición (3 y 7 días) a las atmósferas controladas, disminuyendo el porcentaje de pérdida de peso en frutos sometidos a 7 y 3 días a los tratamientos con atmósferas controladas, respecto a lo obtenido en los tratamientos control con valores de 4.85, 6.29 y 7.13%, respectivamente. No se observó un efecto estadísticamente significativo de las dos composiciones de atmósferas controladas evaluadas de manera independiente, sin embargo, si se observó un efecto significativo de éstas respecto a lo obtenido en el tratamiento control. En los tratamientos evaluados a 10 °C se observó la misma tendencia en la disminución del porcentaje de pérdida de peso en frutos sometidos a las atmósferas controladas respecto a los tratamientos control (Tabla 11).

La disminución significativa en el porcentaje de pérdida de peso se debe principalmente a la reducción significativa de la velocidad de transpiración de los frutos, lo cual se traduce en el mantenimiento de la turgencia celular y de igual manera en una menor pérdida de peso. Por otro lado, no se observó un cambio estadísticamente significativo en el porcentaje de pérdida de peso en frutos almacenados tanto a 1 y 10 °C (4.47 y 4.52%, respectivamente).

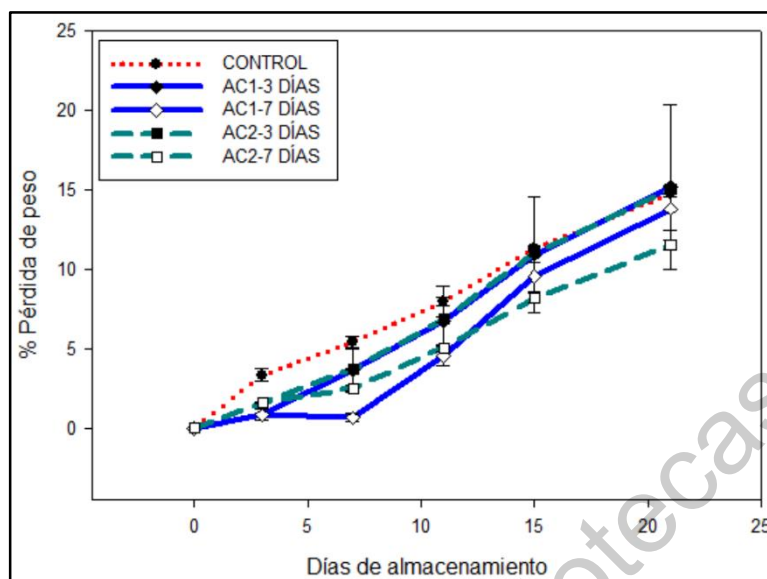


Figura 22. Porcentaje de pérdida de peso de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

Tabla 11. Porcentaje de pérdida de peso de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Porcentaje de pérdida de peso (%)	
1 °C	Control	7.13	a
	3 días	6.29	ab
	7 días	4.85	b
10 °C	Control	5.40	a
	3 días	4.45	ab
	7 días	3.69	b

Como ya se mencionó, el porcentaje de pérdida de peso que puedan llegar a alcanzar las frutillas puede afectar en gran medida su calidad, y por consecuencia su aceptabilidad. El porcentaje de pérdida de peso se da principalmente a través del proceso de transpiración que sufren las frutillas a lo largo de su almacenamiento poscosecha.

La pérdida de agua se ve afectada principalmente por la diferencia de presión del vapor de agua y la presión de vapor presentada por el ambiente que rodea al fruto, así como de la temperatura del ambiente. Además de lo anteriormente mencionado, la pérdida de agua provocará la pérdida de la turgencia celular y esto afectará en gran medida la firmeza de los frutos.

Ante la pérdida masiva de agua, el fruto tiene la capacidad de responder ante dicho estrés a través de la acumulación de compuestos osmóticamente activos entre los cuales se encuentran diversas proteínas hidrofílicas como las dehidrinas. Diversas investigaciones se han centrado en estudiar la actuación de este tipo de proteínas y su rol durante la pérdida de agua.

Estas proteínas por sus propiedades fisicoquímicas tienen la capacidad de unirse a las moléculas de agua, impidiendo su salida de las células, de igual manera son capaces de unirse a cierto tipo de proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y membranas. La capacidad de unirse a las membranas celulares y algunos fosfolípidos también les confiere la capacidad de mantener la integridad de la membrana celular así como mantener su fluidez, y esto trae como consecuencia una pérdida menor de la membrana celular, así como menores índices de ruptura. Una mayor integridad de la membrana celular ayuda a reducir la pérdida masiva de agua.

Lo anteriormente dicho fue corroborado por Vázquez et al., (2018) en donde evaluaron el efecto de atmósferas con altas concentraciones de CO_2 ($20\% \text{O}_2 + 20\% \text{CO}_2 + 60\% \text{N}_2$) durante 72 horas sobre la acumulación y actividad de cuatro isoformas de dehidrinas y su relación con la pérdida de agua y la integridad de la membrana celular en frutos de uva de mesa. Los resultados obtenidos fueron bastante favorables, logrando reducir hasta en un 50% la pérdida de peso bajo condiciones de alta concentración de CO_2 . De igual manera los resultados mostraron un incremento de hasta 3 veces en la acumulación de las isoformas DHN27, DHN22 y DHN17, lo cual muestra su implicación directa en la reducción de la pérdida de agua de los frutos.

Dichos autores mencionan que la isoforma DHN22 tiene un papel crítico durante la pérdida de agua, debido a que esta enzima es capaz de unirse tanto a moléculas de agua como a iones metálicos, posibilitándole la capacidad de retener considerables cantidades de agua así como ejercer un efecto amortiguador sobre el incremento de iones durante la deshidratación, ayudando a mantener la homeostasis celular (Allagulova et al., 2003).

A través de la aplicación de altas concentraciones de dióxido de carbono se logró reducir de manera significativa la peroxidación lipídica, lo cual implica una mayor integridad de la membrana celular (Allagulova et al., 2003).

De igual manera la isoforma DHN22 tiene un gran papel en la integridad de la membrana, debido a que esta enzima es capaz de unirse a los fosfolípidos de la membrana celular, y como ya se mencionó anteriormente, se logra mantener una mayor fluidez de la membrana durante el almacenamiento poscosecha (Allagulova et al., 2003).

Navarro et al., (2015) evaluaron el efecto de atmósferas con 20% de dióxido de carbono durante 3 días sobre la acumulación relativa de 4 isoformas de proteínas dehidrasas (DHN17, DHN22, DHN27 y DHN44) así como los niveles de expresión de los genes *VvDHN1*, *VvDHN2*, *VvDHN3* y *VvDHN4* y su relación con los niveles de pérdida de agua en frutos de uva de mesa. El efecto de las altas concentraciones de dióxido de carbono muestra una disminución en la acumulación relativa de la isoforma DHN27, sin embargo, se observó un incremento significativo de hasta 1.7 y 1.4 veces en la acumulación relativa de DHN17 y DHN22 respecto a lo obtenido en las frutas no tratadas. De igual manera, se observó un incremento durante los primeros 3 días de tratamiento de la isoforma DHN44 manteniéndose constante durante el resto del almacenamiento poscosecha. Por otro lado, se observó un incremento significativo en los niveles de transcripción de los genes *VvDHN4* y *DHN4*.

Por otro lado, se ha planteado que los genes codificantes para diversas dehidrasas poseen una región promotora de la transcripción llamada CRT/DRE (C-repeat (CRT) dehydration responsive element (DRE)) y a esta se unen factores de transcripción que promueven el proceso, llamados CBFs (C-repeat binding factors). Se ha demostrado que altas concentraciones de dióxido de carbono estimulan un incremento en los niveles de transcripción que codifican para estos factores de transcripción.

Lo anterior fue demostrado por Fernández et al., (2012), donde evaluaron el efecto de atmósferas con 20% CO₂ sobre los patrones de expresión de los genes *VvCBF1*, *VvCBF4* y *VvDHN1a*, los cuales codifican para los factores de transcripción CBF1, CBF4 y la dehidrasa DHN1a respectivamente, en piel, pulpa y semilla de uvas de mesa.

Los resultados no mostraron un efecto del dióxido de carbono en la expresión de *VvCBF1* y para *VvCBF4* en la piel de la uva, sin embargo, se observó un incremento significativo de hasta 3.6 y 3.4 veces en los niveles de expresión de *VvCBF1* y *VvCBF4* en la pulpa de los frutos por efecto del CO₂. De igual manera se observó un incremento en la expresión de *VvDHN1a*.

El incremento en los niveles de las diferentes isoformas de las dehidrasas como consecuencia de la implementación de atmósferas con altas concentraciones de CO₂ fortalece la hipótesis de su relación directa en la reducción de la pérdida de agua intracelular, y por consecuencia menores porcentajes pérdidas de peso.

Los resultados obtenidos en la presente investigación (con una reducción en el %PP de hasta 32% en frutos sometidos durante 7 días a las atmósferas controladas respecto al tratamiento control) coinciden con lo obtenido por Brackman et al., (2015), en donde obtuvieron porcentajes de pérdida de peso de hasta 0.9% en atmósferas altas en dióxido de carbono en comparación con la pérdida de peso de hasta 4.45% en los tratamientos control en zarzamora de la variedad "Guaraní".

6.1.3. Efecto de las atmósferas controladas en la tasa de respiración.

A través de los resultados obtenidos se observó un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los tratamientos evaluados a 1 y 10 °C respecto al tratamiento control. Se puede apreciar un efecto significativo de los días de almacenamiento poscosecha, en los cuales se incrementó la tasa de respiración conforme se incrementaron los días de almacenamiento, tanto a 1 como a 10 °C (Figura 23). De igual manera, se observa una disminución significativa en la tasa de respiración conforme se incrementó el tiempo de exposición a las atmósferas controladas, disminuyendo la tasa de respiración de 7.99 mL CO₂/kg*h para el tratamiento control a 6.48 y 5.49 mL CO₂/kg*h para 7 y 3 días de exposición a las atmósferas controladas a 1 °C (Tabla 12). Por otro lado, se observó un incremento estadísticamente significativo de la tasa de respiración en frutos almacenados a 10 °C, respecto a lo obtenido en frutos almacenados a 1 °C (5.90 y 23.69 mL CO₂/kg*h) durante 15 días de almacenamiento. El incremento en la tasa de respiración a 10 °C está relacionada directamente con el abuso de temperatura, ya que el aumento en esta acelerará automáticamente la tasa metabólica de los frutos, obteniendo tasa respiratorias más altas como se observó.

Esta reducción significativa en la tasa de respiración puede estar estrechamente relacionada con una menor pérdida de peso registrada en los tratamientos con atmósferas controladas, en donde de igual manera se registraron menores porcentajes de pérdida de peso conforme se incrementó el tiempo de exposición a las atmósferas controladas.

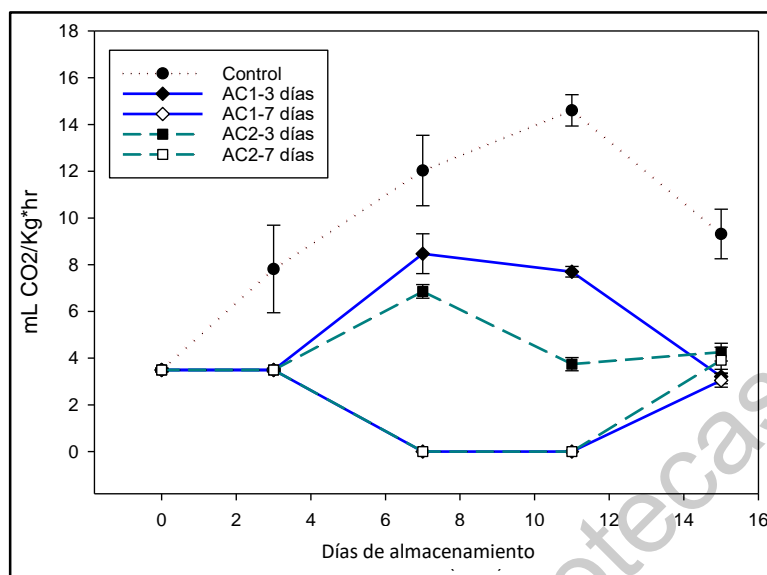


Figura 23. Cambios en la tasa de respiración (mL CO₂/Kg*Hr) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 15 días de almacenamiento a 1 °C.

Tabla 12. Disminución de la tasa de respiración de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de AC por 3 y 7 días y su posterior almacenamiento durante 21 días a 1 y 10 °C.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Tasa de respiración (mL CO ₂ /Kg*Hr)	
1 °C	Control	8.79	c
	3 días	5.49	d
	7 días	3.42	e
10 °C	Control	24.43	a
	3 días	25.31	a
	7 días	21.32	b

La respiración de los frutos es un proceso metabólico que provee de la energía necesaria a los frutos para poder llevar a cabo sus procesos bioquímicos, y en donde los frutos son capaces de usar una diversa gama de sustratos para poder llevar a cabo estas reacciones, principalmente; carbohidratos, lípidos y ácidos orgánicos (Fonseca et al., 2002).

Por todo lo anterior, la tasa de respiración de los frutos, así como la cantidad sólidos solubles totales son los principales indicadores de la actividad metabólica de los frutos, por lo que el control de este parámetro es de suma importancia para la preservación de las características de calidad de los frutos, así como poder alargar su vida de anaquel.

Como ya se mencionó anteriormente, el sistema respiratorio y principalmente el flujo de carbono de la glucólisis hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos es dependiente de ciertas enzimas clave y principalmente de la piruvato deshidrogenasa, quien cataliza la descarboxilación del piruvato para la formación de Acetil Co-A. El Acetil Co-A entra al ciclo de Krebs para su completa descarboxilación y la generación de CO₂ principalmente, además de la generación de NAD⁺H y FADH₂.

Por otro lado, a través de las altas concentraciones de dióxido de carbono se logra disminuir significativamente la concentración de los ácidos orgánicos intermediarios del ciclo de Krebs, así como la actividad de las enzimas que intervienen en dicho ciclo. Dicho argumento fue corroborado por Noguchi et al., (2018) quienes evaluaron el efecto de atmósferas con 590 µmol de CO₂ respecto a un tratamiento control bajo condiciones atmosféricas estándar sobre la acumulación de los ácidos orgánicos presentes en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, así como de las enzimas que intervienen en dicho ciclo.

Los resultados muestran una reducción significativa de la concentración de α -cetoglutarato así como de la relación α -cetoglutarato/isocitrato. Los resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas para el resto de los intermediarios. Los resultados reportados por dicho autor mostraron que la disminución en la concentración del α -cetoglutarato se debió principalmente a una reducción significativa en la actividad enzimática de las enzimas aconitasa e isocitrato deshidrogenasa, lo cual explica que se obtuviera una reducción significativa en la

concentración de isocitrato, lo cual implica que disminuye la disponibilidad de sustrato para la isocitrato deshidrogenasa. Por último, reportan una reducción significativa en la producción de dióxido de carbono, es decir, se logró reducir la tasa de respiración, y esto se produjo principalmente a la reducción en la actividad de la isocitrato deshidrogenasa, la cual cataliza la descarboxilación del isocitrato dando como productos de reacción α -cetoglutarato y dióxido de carbono.

La reducción significativa de la tasa de respiración en la presente investigación coincide con lo anteriormente planteado por Noguchi et al., (2018), logrando obtener una tasa de respiración prácticamente nula en los frutos expuestos por un tiempo de 7 días a cualquiera de las dos composiciones de atmósferas controladas evaluadas. Esta reducción en dicho parámetro permite preservar durante mayor tiempo las características de calidad deseadas en la zarzamora.

La investigación llevada a cabo por Brackman et al., (2016) en zarzamoras, no arrojó resultados favorables en cuanto a tasa de respiración, debido a que no se observaron diferencias estadísticas significativas entre las atmósferas controladas y los tratamientos control, pese a que las frutillas fueron expuestas hasta por 12 días a los tratamientos.

6.1.4. Efecto de las atmósferas controladas en la firmeza y enzimas de la degradación de la pared celular: poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y celulasa.

De los resultados obtenidos en los tratamientos evaluados a 1 °C, se puede observar un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha y del tiempo de exposición a los tratamientos con atmósferas controladas, así como la interacción entre ambos factores individuales. Se puede observar una disminución significativa de la firmeza de los frutos a lo largo de los 21 días de almacenamiento poscosecha, obteniendo valores desde 8.65 N en el día cero hasta 5.36 N en el día 21 de almacenamiento poscosecha (Figura 24).

Como ya se mencionó, se mantuvo de manera significativa la firmeza de los frutos conforme se incrementaron los días de exposición a las atmósferas controladas respecto a los tratamientos control, obteniéndose valores de 5.65, 7.12 y 7.72 N para los tratamientos control, 3 y 7 días de exposición a las atmósferas controladas respectivamente (Figura 28) (Tabla 13). Se observó un mayor mantenimiento estadísticamente significativo en frutos almacenados a 1 °C respecto a lo obtenido en los frutos almacenados a 10 °C (7.13 y 6.72 N, respectivamente) durante 15 días de almacenamiento poscosecha.

Hwang et al., (2014) y Lange y Kader., (1997) reportaron un efecto significativo de las altas concentraciones de CO₂ sobre el pH apoplástico, demostrando que al entrar el CO₂ en contacto con la región apoplástica se disuelve y provoca la acidificación del mismo. Así mismo, la acidificación del pH apoplástico ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de las enzimas de la degradación de la pared celular, y como consecuencia se logra mantener una mayor integridad de la pared celular, lo que nos permite obtener frutos con una mayor firmeza. Por lo anterior, se planteó evaluar la actividad de las principales enzimas de la degradación de la pared celular en zarzamora. Zhang et al., (2019) evaluaron la actividad de las enzimas de la degradación de la pared celular a lo largo del desarrollo de los frutos de zarzamora, desde los 9 hasta los 39 días después de la floración, etapa en la cual la variedad de zarzamora evaluada ya se encuentra en madurez de consumo.

Dichos autores evaluaron la actividad de enzimas como poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, celulasa, β -galactosidasa, α -L-arabinofuranosidasa y xiloglucan endotransglicosidasa, encontrando una mayor actividad de las enzimas poligalacturonasa, celulasa y pectinmetilesterasa a los 39 días después de la floración. De igual manera, encontraron un cambio significativo en los productos de la reacción de éstas enzimas con los componentes de la pared celular, tales como una disminución en la cantidad de celulosa, un incremento en los componentes pécticos solubles en agua y una disminución en el contenido de hemicelulosa.

La presente investigación se basó en los resultados reportados por Zhang et al., (2019) para evaluar el efecto de las atmósferas controladas en la actividad de las enzimas poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y celulasa. Los resultados obtenidos de la evaluación de dichas enzimas se presentan a continuación.

A partir de los resultados obtenidos de la evaluación de los tratamientos a 1 °C, se puede observar un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha y los tiempos de exposición a las atmósferas controladas (3 y 7 días), así como su interacción sobre la actividad de celulasa. Se puede observar una disminución en la actividad enzimática conforme aumentan los días de almacenamiento poscosecha, disminuyendo la actividad desde 10.84 mg glucosa*g⁻¹ Proteína*h en el día cero hasta 5.33 mg glucosa*g⁻¹ Proteína*h en el día 21 de almacenamiento, lo cual concuerda con lo obtenido en los valores de firmeza de los frutos, donde se observó una disminución de su firmeza conforme pasaban los días de almacenamiento poscosecha. Se puede observar una disminución en la actividad de celulasa conforme se incrementan los días de exposición a los tratamientos, obteniendo valores de 7.43, 6.58 y 6.37 mg glucosa*g⁻¹ Proteína*h para el tratamiento control, 3 y 7 días de exposición a las atmósferas controladas respectivamente, obteniendo frutos con una mayor integridad de la pared celular y de sus componentes, provocando que los frutos presenten una mayor resistencia a la prueba por compresión (Figura 25) (Tabla 13). De igual manera, se observó en que los frutos almacenados a 1 °C se incrementó significativamente la actividad de celulasa respecto a la actividad registrada para frutos almacenados a 10 °C

Por otro lado, se observa un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha (0, 3, 7, 11, 15 y 21 días), los tiempos de exposición a las atmósferas controladas y las dos composiciones atmosféricas evaluadas, así como sus interacciones entre éstos factores individuales sobre la actividad específica de poligalacturonasa en frutos almacenados a 1 °C.

A través de lo obtenido se puede observar una disminución en la actividad de poligalacturonasa conforme se incrementaron los días de exposición a las atmósferas controladas respecto al control, obteniendo valores de 22.25, 22.80 y 23.35 mg ác. galacturónico*g⁻¹ Proteína*h para 3 y 7 días a las atmósferas controladas y el control respectivamente (Tabla 13).

De igual manera, se observó una disminución de la actividad enzimática al someter a las frutillas a la atmósfera controlada 2 respecto a la atmósfera controlada 1 con valores de 22.02 y 22.97 mg ác. galacturónico*g⁻¹ Proteína*h respectivamente, siendo valores significativamente menores a lo obtenido en los tratamientos control. Tal y como se observó en la actividad de celulasa, para la actividad de poligalacturonasa se observa una disminución significativa de su actividad conforme aumentaron los días de almacenamiento poscosecha, disminuyendo su actividad de 40.80 mg ác. galacturónico*g⁻¹ Proteína*h en el día cero de almacenamiento hasta 15.70 mg ác. galacturónico*g⁻¹ Proteína*h en el día 21 de almacenamiento poscosecha. De los resultados obtenidos, se puede observar una relación de los resultados de la evaluación de la firmeza de los frutos con los datos de la actividad de poligalacturonasa, obteniendo valores más altos en la actividad de poligalacturonasa en los tratamientos control, y obteniéndose menores valores de firmeza en los tratamientos control (Figura 26) (Tabla 13).

Por último, se observó un efecto estadísticamente significativo del factor temperatura, en donde se redujo de manera significativa la actividad de poligalacturonasa en frutos almacenados a 10 °C, respecto a lo obtenido en la actividad en frutos almacenados a 1 °C (21.87 y 24.21 mg ác. galacturónico*g⁻¹ proteína*h).

Para la actividad de pectinmetilesterasa se observó un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha, sin embargo, no se observó un efecto estadísticamente significativo de la composición de las atmósferas controladas y del tiempo de exposición a las atmósferas controladas, lo que nos quiere decir que la actividad de dicha enzima no se ve afectada por la aplicación de altas concentraciones de CO_2 .

Los resultados obtenidos en la evaluación de los tratamientos a 10°C mostraron la misma tendencia que lo observado en los tratamientos evaluados a 1°C (Tabla 13).

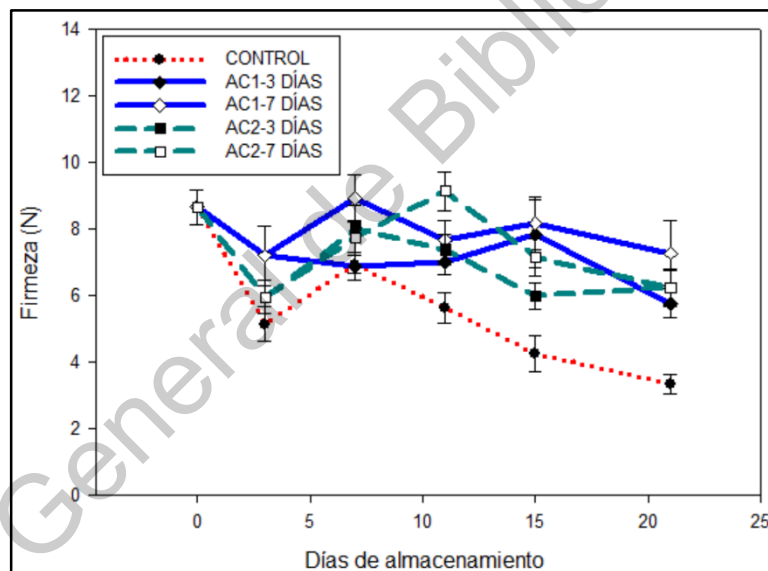


Figura 24. Cambios en la firmeza (N) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas: control en aire, AC1: $15\%\text{CO}_2 + 10\%\text{O}_2$ y AC2: $15\%\text{CO}_2 + 5\%\text{O}_2$ durante 21 días de almacenamiento a 1°C .

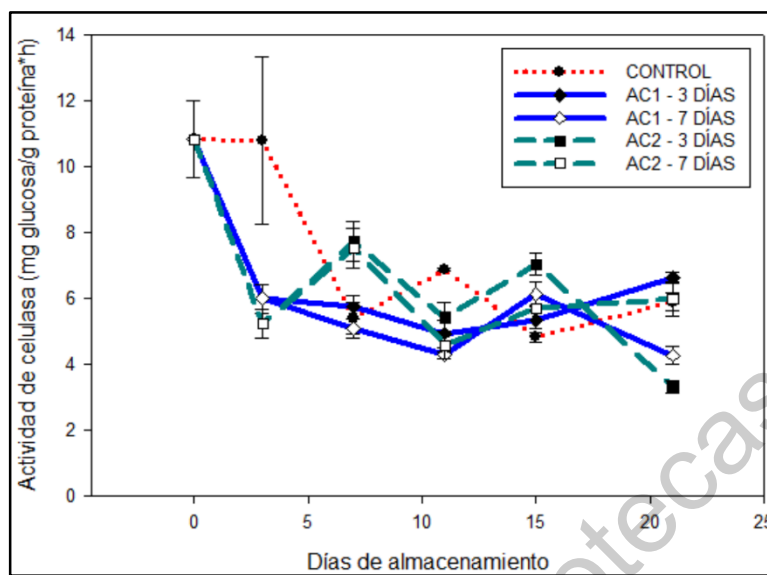


Figura 25. Cambios en la actividad específica de celulasa (mg glucosa/g Proteína) en frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

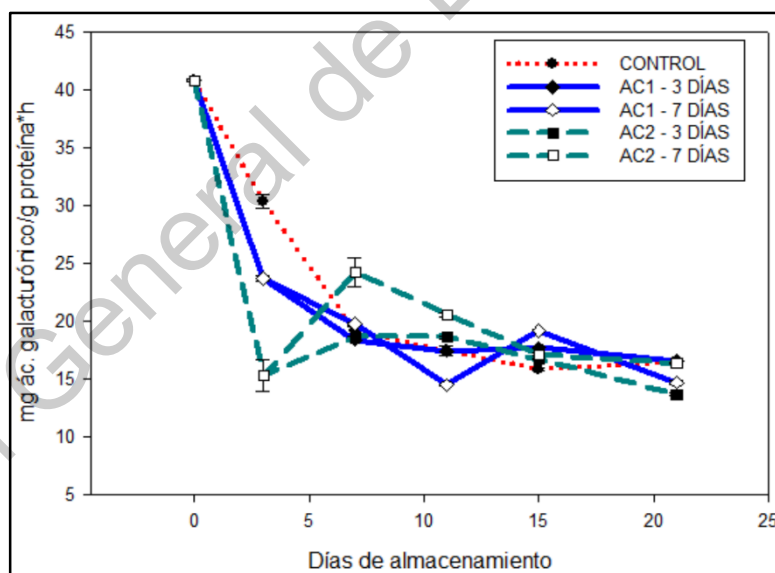


Figura 26. Cambios en la actividad específica de poligalacturonasa (mg ác. galacturónico/g Proteína) en frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C

Tabla 13. Comparación de medias de los valores de firmeza y actividad enzimática de la pared celular en frutos de zarzamora sometidos a diferentes condiciones de atmósferas controladas por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Firmeza (N)	Poligalacturonasa (mg ácido galacturónico/g proteína*h)	Celulasa (mg glucosa/g proteína*h)
1 °C	Control	5.65 a	23.35 a	7.43 a
	3 días	7.12 b	22.80 b	6.58 b
	7 días	7.72 c	22.25 c	6.37 b
10 °C	Control	5.53 a	22.24 a	6.11 a
	3 días	7.05 b	22.05 a	6.23 a
	7 días	7.56 b	21.34 b	5.98 a

La disminución significativa en la pérdida de firmeza de los frutos sometidos a las atmósferas controladas, principalmente los frutos sometidos por 7 días se puede relacionar directamente con la reducción en la actividad de las enzimas de la degradación de la pared celular evaluadas. De igual manera, una mayor firmeza se correlaciona directamente con un menor porcentaje de pérdida de peso, es decir, al perder las células una menor cantidad de agua mantiene su turgencia y esto se traduce en una mayor firmeza, además de una mejora en la apariencia visual lo que se traduce en una mayor aceptabilidad por los consumidores.

De igual manera, es posible que las dehidrasas son capaces de unirse a fosfolípidos de membrana, y esto ayudará a mantener una mayor estabilidad de la misma, manteniendo de manera significativa su integridad física evitando su pérdida gradual a medida que se incrementan los días de almacenamiento poscosecha. Una mayor integridad evitará una pérdida masiva de agua, manteniendo la turgencia celular Vázquez et al., (2018).

Vázquez-Hernández et al., (2018) confirmaron el papel de las dehidrasas en la disminución significativa de la pérdida de firmeza en uvas de mesa.

Estos autores llevaron a cabo la evaluación de atmósferas con una composición de 20% O₂, 20% CO₂ y 60% N₂ sobre la firmeza de los frutos y su relación con la expresión de 4 isoformas de dehidrininas a temperaturas de 0 y 20 °C. Sus resultados mostraron una disminución significativa en la pérdida de firmeza de los frutos sometidos a ambas temperaturas, sin embargo, se observaron mejores valores de firmeza en frutos sometidos a altas concentraciones de CO₂ con valores de 0.56 y 0.66 N para el control y la atmósfera controlada respectivamente a 1°C. A una temperatura de 20 °C se mantuvo la firmeza hasta en 0.62 N, respecto a 0.58 N en el tratamiento control. La disminución en la pérdida de la firmeza se correlacionó directamente en un menor porcentaje de peroxidación lipídica de hasta 11% respecto a un 24% de peroxidación lipídica obtenida en el tratamiento control. A su vez, la disminución en la peroxidación lipídica se relacionó directamente con el aumento en la acumulación relativa en las dehidrininas en sus isoformas DHN17 y DHN22.

Los resultados anteriores aunque son contundentes en la bibliografía, las conclusiones no pueden ser definitivas, debido a que no se realizaron dichas pruebas en las muestras de esta investigación. Por lo tanto, de los mayores valores de firmeza observados en esta investigación, podemos asumir con certeza que fueron producto de la inhibición de la actividad de las enzimas celulasa y poligalacturonasa, y en menor medida a pectinmetilesterasa.

Anteriormente se mencionó que se logra la inhibición de la actividad de dichas enzimas gracias a la acidificación del pH apoplástico, sin embargo, Bang et al., (2019) lograron disminuir los niveles relativos de transcritos que codifican para pectinmetilesterasa a través de la implementación de atmósferas con 30% CO₂. La disminución significativa en los niveles de RNAm fueron directamente correlacionados con una disminución significativa de la pérdida de firmeza en fresas. Por su parte Chang et al., (2017) lograron mantener hasta por 4 días los valores iniciales de firmeza en duraznos sometidos hasta por 3 y 12 horas a atmósferas con altas concentraciones de dióxido de carbono.

La disminución en la pérdida de firmeza se correlacionó directamente en la inhibición de la actividad de la poligalacturonasa desde 6 $\mu\text{mol/g}$ PF en el tratamiento control hasta 2 $\mu\text{mol/g}$ PF en los frutos sometidos a las atmósferas controladas.

Diversos autores han señalado el papel de las altas concentraciones de dióxido de carbono en el pH apoplástico así como su papel en el flujo de calcio hacia la zona apoplástica produciendo mayores valores de firmeza. Por su parte, Hwang et al., (2014) realizaron la identificación de mecanismos potenciales asociados a los cambios en la firmeza de fresas sometidas a atmósferas con altas concentraciones de dióxido de carbono en combinación con la aplicación altas concentraciones de nitrógeno, aplicación exógena de calcio, así como inhibidores de canales de calcio como la ATPasa tipo P (bomba de calcio transmembranal). Los resultados mostraron un incremento de hasta 39.1% en la firmeza de los frutos sometidos a los altos niveles de CO_2 . Para comprobar que el incremento en la firmeza es debido a la condición de anoxia provocada por el CO_2 y el completo consumo de O_2 , se evaluó el efecto de atmósferas de composición 100% en nitrógeno, mostrando que los valores de firmeza fueron menores a los tratamientos con dióxido de carbono y estadísticamente iguales a los tratamientos control (condiciones atmosféricas estándar). Los resultados indican que un ambiente anóxico no es del todo necesario para obtener incrementos en los valores de firmeza, por lo que se evaluó la aplicación de inhibidores (vanadato de sodio y Eritrosin B) de la ATPasa en combinación con altas concentraciones de dióxido de carbono. Los resultados mostraron una disminución significativa en los valores de firmeza en frutos previamente tratados con inhibidores de la bomba de calcio, además de una disminución significativa del contenido de calcio unido a la pared celular, lo cual indica una inhibición significativa de la actividad de la ATPasa (bomba de calcio). Estos resultados muestran el papel importante de la acidificación provocada por el dióxido de carbono en el transporte de calcio a la región apoplástica.

Por último, para corroborar el papel del dióxido de carbono sobre el flujo de calcio y en la firmeza de los frutos, se evaluó la aplicación exógena de calcio en combinación con dióxido de carbono y cambios en los valores del pH (3.5 y 7). Los resultados mostraron un incremento significativo de la firmeza en frutos con aplicación exógena de calcio a un pH de 3.5 y altas concentraciones de CO₂. Los resultados indican que la acidificación del apoplasto estimulada por los altos niveles de CO₂ estimula el flujo de calcio al apoplasto provocando su unión a los polímeros pécticos (dando la formación de pectatos de calcio). Las condiciones de igual manera provocaron una disminución significativa en la actividad de pectato liasa.

6.1.5. Efecto de las atmósferas controladas en el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas y en el color.

Respecto al contenido de antocianinas monoméricas en los frutos sometidos a los tratamientos, a 10 °C se puede observar un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) del tiempo de exposición a las atmósferas controladas. Es evidente una disminución significativa en el contenido de antocianinas monoméricas a medida que se aumentó el tiempo de exposición a las atmósferas controladas respecto a los tratamientos control. En los tratamientos control se registró un valor de 297.79 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF, significativamente mayor a los obtenido en los tratamientos de 3 y 7 días de exposición a las atmósferas controladas, obteniéndose valores de 238.72 y 215.66 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF. A diferencia de los parámetros evaluados para determinar la calidad poscosecha de los frutos, se observó un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de las dos composiciones de atmósferas evaluadas obteniendo valores de 258.92 y 242.53 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF para la atmósfera controlada 1 y la atmósfera controlada 2 respectivamente, valores significativamente menores a lo obtenido en los frutos control con un contenido de antocianinas de 297.79 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF. (Figura 28) (Tabla 15).

Por otro lado, se logró observar una disminución en la degradación de antocianinas monoméricas en frutos almacenados a 1 °C, respecto a lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (214.08 y 250.73 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF, respectivamente), lo cual evidencia un claro efecto del abuso de la temperatura en frutos almacenados a 10 °C.

A través de la evaluación de antocianinas por HPLC se logró identificar que la cianidina-3-O-glucósido es la antocianina predominante en las zarzamoras; la cual se identificó a través de un estándar comercial, el tiempo de retención y su curva espectral (Figura 27).

Los resultados muestran una disminución significativa en el contenido de Cianidina-3-O-glucósido a medida que se incrementó el tiempo de exposición a las atmósferas controladas. Los resultados arrojan que en el tratamiento control se obtuvo una concentración de 132.13 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF, valores significativamente superior a lo obtenido en frutos expuestos durante 3 y 7 días a las atmósferas controladas con valores de 108.39 y 99.12 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF respectivamente.

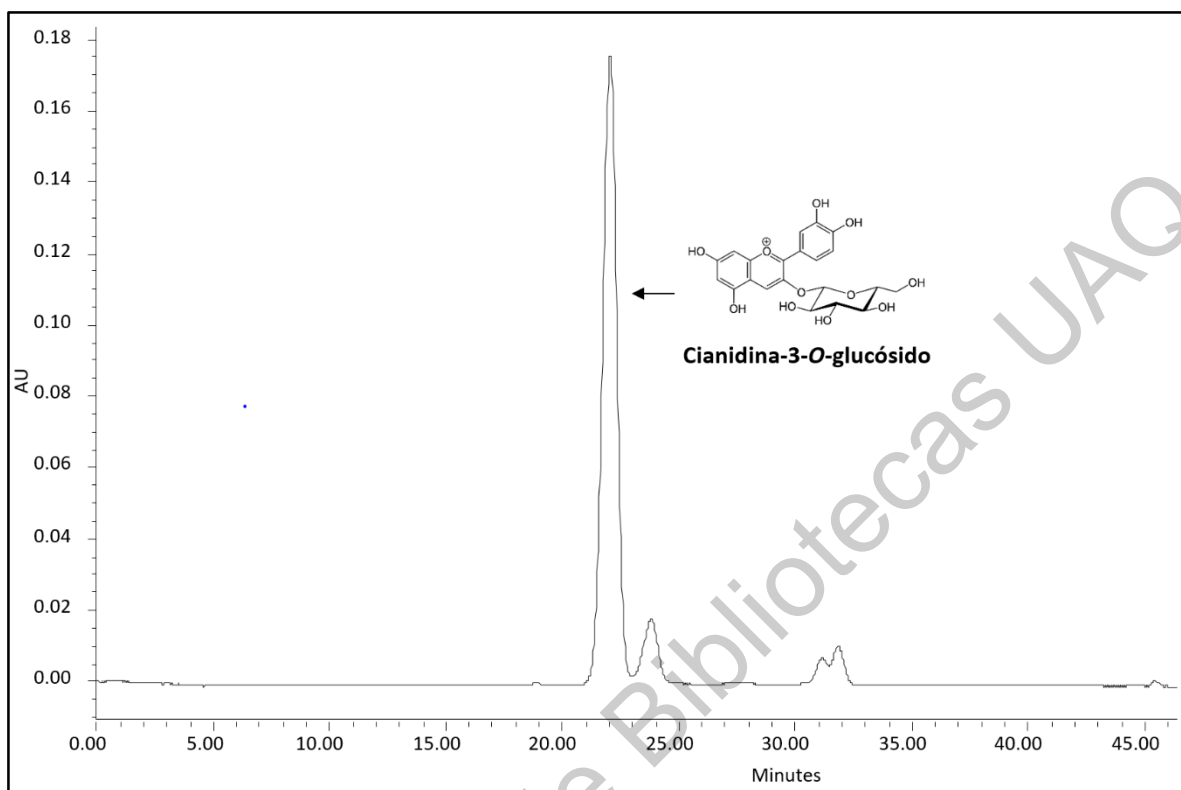


Figura 27. Cromatograma HPLC-DAD a 520 nm del extracto fenólico de Ziziphus jujuba tratamiento Control día 0. Picos: 2 y 3-desconocidos; Pico 1: cianidina -3-O-glucósido.

Tabla 14. Comparación de media del cianidina-3-O-glucósido (mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂.

Días de exposición	Mg/100 g PF cianidina-3-O-glucósido
0 días	132.13a
3 días	108.39b
7 días	99.12c

Respecto al porcentaje de antocianinas poliméricas, en la Figura 29 se puede apreciar una mayor polimerización en los frutos control, disminuyéndose de manera significativa a medida que se incrementa el tiempo de exposición de los frutos a las atmósferas controladas. Los valores obtenidos son de 30.33, 24.37 y 23.91 % de color polimérico para los tratamientos control, 3 y 7 días de exposición a las atmósferas controladas respectivamente, a una temperatura de 10 °C. De igual manera se puede apreciar un menor porcentaje de polimerización en los frutos sometidos a la atmósfera controlada 1 respecto a la atmósfera controlada 2 con porcentajes de polimerización de 28.63 y 23.78 %, tal y como se observó para el contenido de antocianinas monoméricas a 10 °C. Ésta disminución en la polimerización de las antocianinas en los tratamientos con atmósferas controladas y el tiempo de exposición nos dice de igual manera que a través de la implementación de éstos tratamientos se disminuye de manera significativa el índice de degradación de las antocianinas, las cuales, al ser las responsables del característico color negro de las zarzamoras es importante preservarlas a lo largo del almacenamiento poscosecha (Tabla 15). De la comparación de resultados tanto a 1 y a 10 °C, se puede observar una disminución significativa en el porcentaje de polimerización en frutos almacenados a 1 °C (214.08%) respecto a lo obtenidos en frutos almacenados a 10 °C (26.21%), lo que supone un incremento significativo en las reacciones de degradación enzimática de las antocianinas y por consecuencia un incremento en el porcentaje de polimerización por efecto del incremento en la temperatura.

De igual manera, una mayor polimerización de las antocianinas en la zarzamora aumenta de manera significativa la aparición de defectos de calidad en la zarzamora, provocando la generación de un fenómeno denominado “reversión de color de las zarzamoras”, el cual es provocado por un cambio en la estructura de las antocianinas, el cual se produce principalmente por procesos de polimerización o copigmentación de las antocianinas, lo cual de igual manera provoca un cambio en la capacidad de absorción de energía de la antocianina, por lo tanto provocará a

su vez un cambio en la coloración de la zarzamora, generando la pérdida de su calidad.

Por lo anterior, se planteó evaluar las características colorimétricas de los frutos de zarzamora sometidos a los tratamientos con atmósferas controladas y el tiempo de exposición al que se sometieron a dichas condiciones. Por lo tanto, en cada muestreo realizado se evaluaron los parámetros colorimétricos L, a*, b* y a partir de éstos parámetros se determinó el ΔE , obteniéndose los siguientes resultados.

Para el parámetro colorimétrico "L" se observó un efecto estadísticamente significativo de los días de exposición, el tiempo de exposición a las atmósferas controladas y la interacción entre ambos factores a 1 °C. En la Figura 30, se puede apreciar una reducción significativa en el valor de "L" a medida que se incrementa el tiempo de exposición a las atmósferas controladas respecto a lo obtenido en el tratamiento control, obteniéndose valores de 20.34, 19.90 y 19.79 para el tratamiento control y 3 y 7 días de exposición a las atmósferas controladas respectivamente, lo que indica que en los tratamientos control los frutos adquieren una apariencia menos opaca, lo cual se traduce en una pérdida de la calidad de las frutillas. Por otro lado, las frutillas sometidas a las atmósferas controladas conservaron en menor medida las características de luminosidad (Tabla 16). Por otra parte, en frutos almacenados a una temperatura de 1 °C se observan valores de "L" estadísticamente mayores en comparación con lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (20 y 19.82, respectivamente) durante 15 días de almacenamiento poscosecha.

Por otra parte, en la Figura 31 se puede observar que las frutillas sometidas a las atmósferas controladas y a temperatura de 1°C fueron estadísticamente ($p \leq 0.05$) afectadas por los días de almacenamiento poscosecha, en donde se puede observar un incremento en el parámetro colorimétrico a* conforme aumentan los días de almacenamiento poscosecha, obteniendo valores de a* de 1.75 en el día cero de almacenamiento hasta valores de 3.50 en el día 21, lo que indica un

incremento en la velocidad de senescencia y pérdida de la calidad de los frutos, volviéndose hacia coloraciones rojas, propias de frutos con defecto de reversión de color. Por otro lado, en la Figura 31, se puede apreciar que existe un efecto estadísticamente significativo del tiempo de exposición a las atmósferas controladas respecto al control, obteniendo valores más pequeños de a^* conforme se incrementó el tiempo de exposición a las atmósferas controladas. En dichos tratamientos se obtuvieron valores de 3.43 para el tratamiento control mientras que para los tiempos de exposición de 3 y 7 días a las atmósferas controladas se obtuvieron valores de 2.08 y 1.87 respectivamente. La disminución en dicho parámetro a través de la implementación de las atmósferas controladas, principalmente por 7 días, indica una mayor preservación de las características de calidad deseadas en los frutos de zarzamora y esto está directamente relacionado con una disminución en la reversión de color de los frutos (Tabla 16). Por otra parte, en frutos almacenados a una temperatura de 1 °C se observan valores de “a” estadísticamente mayores en comparación con lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (2.26 y 1.63, respectivamente) durante 15 días de almacenamiento poscosecha.

De igual manera, en la Figura 32, se puede observar un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha, el tiempo de exposición a las atmósferas controladas y la interacción doble entre ambos factores individuales a 1 °C. Se puede observar que al incrementar el tiempo de exposición a cualquiera de las dos composiciones atmosféricas evaluadas se logra disminuir de manera significativa los valores de b^* obtenidos respecto al tratamiento control, registrándose un incremento en los valores desde 0.02 y 0.14 en frutos expuestos a 3 y 7 días a las atmósferas controladas hasta valores de 0.63 en el tratamiento control (Tabla 16). Por otra parte, en frutos almacenados a una temperatura de 1 °C se observan valores de “b” estadísticamente mayores en comparación con lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (0.17 y 0.0098, respectivamente) durante 15 días de almacenamiento poscosecha.

El incremento en los valores del parámetro b^* en los frutos del tratamiento control en conjunto con lo obtenido en los parámetros L y a^* muestran una clara y progresiva disminución de la calidad de los frutos, produciéndose coloraciones rojas opacas las cuales son características de frutos senescentes y de poca calidad.

Por último, a partir de los parámetros de color L , a^* y b^* , se determinó el parámetro Delta E (ΔE), a través del cual se puede visualizar el cambio total en el color que sufrieron los frutos respecto a las características iniciales en el almacenamiento poscosecha a 1 °C.

En la Figura 33, se puede observar que tal y como se observó en los parámetros anteriormente descritos, el cambio del valor de Delta E es más drástico en los frutos del tratamiento control respecto a lo obtenido en los frutos sometidos a las atmósferas controladas, registrándose valores de 2.54 para los frutos del tratamiento control y 1.45 y 1.27 para 3 y 7 días de exposición a las atmósferas controladas respectivamente. Por otra parte, en frutos almacenados a una temperatura de 1 °C se observan valores de "Delta E" estadísticamente mayores en comparación con lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (1.55 y 1.11, respectivamente) durante 15 días de almacenamiento poscosecha. Mayores valores de Delta E y los parámetros anteriormente descritos para los tratamientos control muestran frutos con un mayor índice de senescencia. Por otro lado, un mayor cambio hacia coloraciones rojas puede estar directamente relacionado con un mayor porcentaje de antocianinas polimerizadas en los frutos de los tratamientos control, lo que provocaría de manera irreversible la aparición del fenómeno denominado "reversión de color de las zarzamoras". Los resultados de igual manera muestran una posible relación entre el menor porcentaje de polimerización y la preservación de las características de color de las zarzamoras sometidas a las atmósferas controladas (Tabla 16).

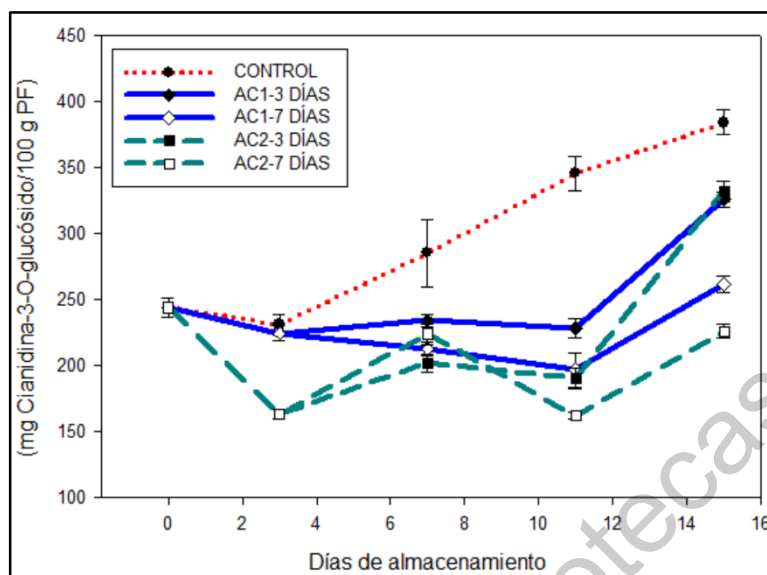


Figura 28. Cambios en las antocianinas monoméricas (mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC's durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 15 días de almacenamiento a 10 °C.

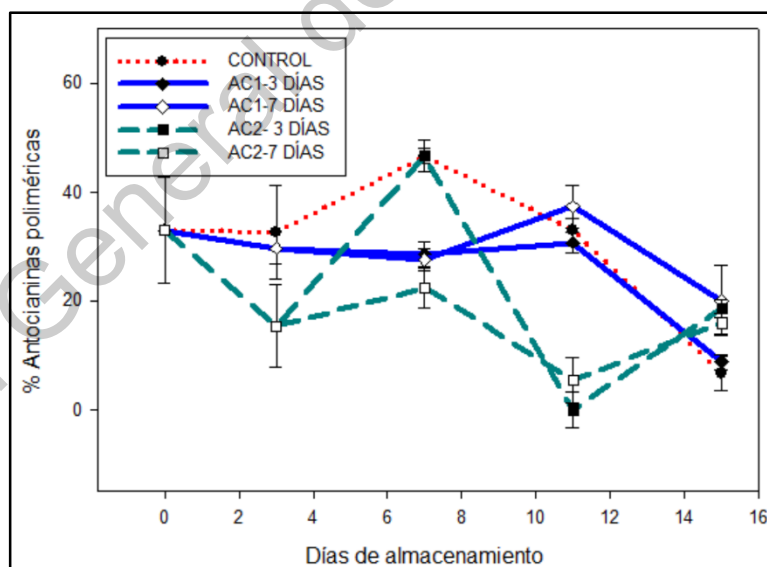


Figura 29. Cambios en el contenido de antocianinas poliméricas en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 15 días de almacenamiento a 10 °C.

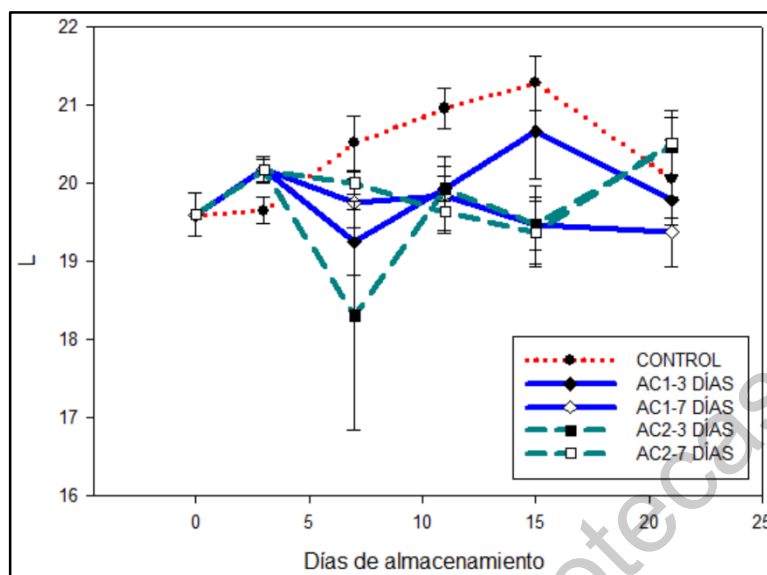


Figura 30. Cambios en el valor de luminosidad "L" de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

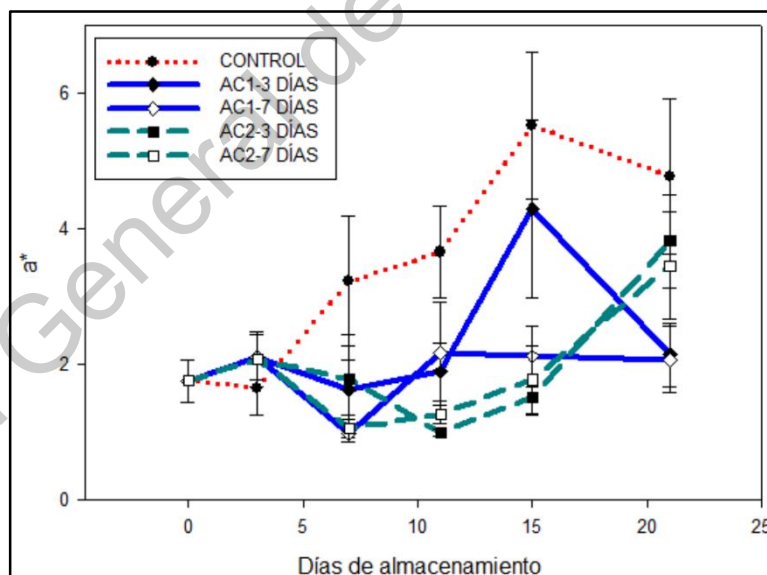


Figura 31. Cambios en el valor de color "a*" de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

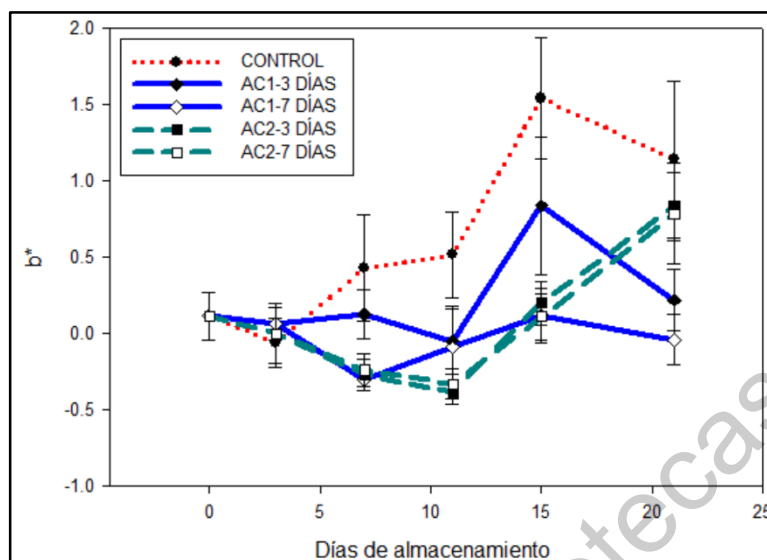


Figura 32. Cambios en el valor de color "b*" de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC durante 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

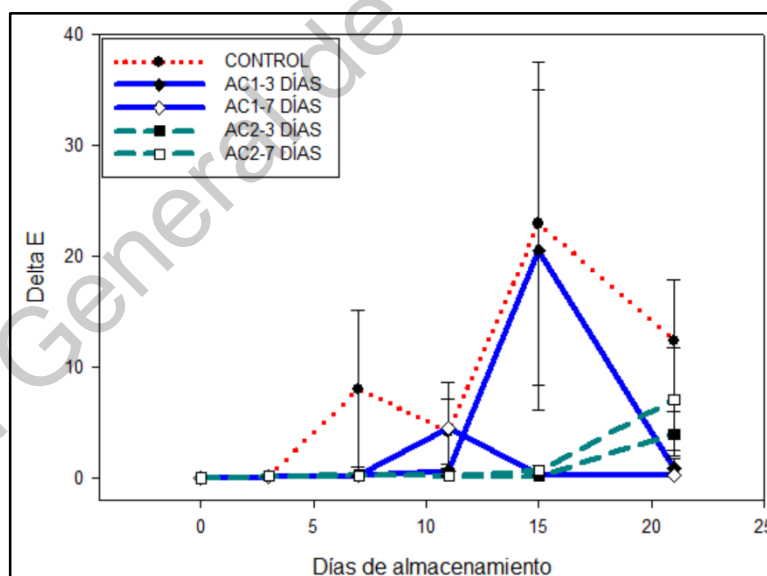


Figura 33. Cambios en la diferencia de color ΔE de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

Tabla 15. Comparación de medias del contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Antocianinas monoméricas (mg Cianidina-3-O-glucósido/100g PF)		Porcentaje de color polimérico (%)	
1 °C	Control	204.84	b	40.52	a
	3 días	234.31	a	25.22	b
	7 días	206.12	b	24.08	b
10 °C	Control	297.79	a	30.33	a
	3 días	238.72	b	24.37	b
	7 días	215.66	c	23.91	c

Tabla 16. Comparación de medias del contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas en frutos de zarzamora sometidos a AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	L	a*		b*		Delta E (ΔE)		
1 °C	Control	20.34	a	3.43	a	0.62	a	2.54	a
	3 días	19.77	b	2.14	b	0.14	b	1.45	b
	7 días	19.79	b	1.87	b	0.02	b	1.27	b
10 °C	Control	19.96	a	1.98	a	0.18	a	1.14	a
	3 días	19.70	a	1.40	b	-0.06	b	1.02	a
	7 días	19.78	a	1.49	b	-0.09	b	1.16	a

Una disminución en el contenido de antocianinas, así como de compuestos fenólicos y flavonoides está directamente relacionado y puede deducirse con seguridad que es producto de la inhibición de las enzimas involucradas en la degradación de compuestos carbonados a través de vías como la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs, principalmente. Como ya se mencionó anteriormente, a través de la implementación de altas concentraciones de dióxido de carbono se logra una inhibición de enzimas como la sacarosa invertasa y la sacarosa sintasa, las cuales suministran glucosa y UDP-glucosa para alimentar a la ruta de las pentosas fosfato y a la glucólisis.

Al disminuir el suministro de sustrato para estas dos vías, se disminuye como consecuencia la generación de fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato, las cuales a través de su condensación generan la fenilalanina necesaria para alimentar la vía de los fenilpropanoides, a través de la cual se sintetizarán los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas.

De igual manera la inhibición de la piruvato deshidrogenasa provocará un déficit de acetil-CoA, el cual a su vez provocará un déficit en la producción de malonil-CoA, sustrato necesario para la chalcona sintasa.

Los resultados de la presente investigación coinciden con lo reportado por Bodelón et al., (2010), en donde evaluaron el efecto de atmósferas con 20% O₂ + 20% CO₂ + 60% N₂ por 3 días de exposición de frutos de fresa sobre la composición y el contenido de las principales antocianinas por HPLC (pelargonidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-galactosido, pelargonidina-3-rutinósido, pelargonidina-3-malonil-glucósido y pelargonidina-3-acetil-glucósido). Los resultados muestran una reducción significativa en el contenido de antocianinas en los tratamientos con altas concentraciones de dióxido de carbono, donde la pelargonidina-3-glucósido, la cual es la antocianina predominante, disminuyó su contenido de 393 µg/g PF a 344 µg/g PF para los tratamientos con dióxido de carbono y bajo condiciones atmosféricas estándar, respectivamente.

De igual manera, dichos autores encontraron una relación directa entre en contenido de antocianinas y las características colorimétricas de los frutos, reportando una disminución significativa en el parámetro colorimétrico "a*" de 28.53 a 23.20, en "b*" de 7.15 a 1.36 y en Hue de 13.80 a 3.15 para los tratamientos control y los tratamientos con altas concentraciones de CO₂, respectivamente. La disminución en dichos parámetros, y como consecuencia la pérdida de color de los frutos, se relacionó principalmente con el contenido de antocianinas.

Además del efecto de las rutas centrales del metabolismo primario, a través de diversas investigaciones se ha comprobado que las altas concentraciones de dióxido de carbono tienen un efecto significativo sobre la actividad de enzimas de la ruta de los fenilpropanoides y la vía de los flavonoides para la síntesis de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, así como en los niveles de transcripción de genes que codifican para ciertas enzimas. Esto fue corroborado por Dong et al., (2019), donde a través de la implementación de atmósferas con altas concentraciones de dióxido de carbono evaluaron el efecto de estas sobre enzimas como fenilalanina amonio liasa, enzima clave en el inicio de la ruta del shikimato catalizando la formación de ácido cinámico, la cinamato-4-hidroxilasa, enzima clave para la síntesis de compuestos fenólicos en la ruta de los fenilpropanoides, participando en la formación de ácido *p*-coumárico, la 4-coumaroil:CoA ligasa, enzima clave de la ruta de los fenilpropanoides que cataliza la formación de *p*-coumaroil CoA el cual es el sustrato clave para la vía de los flavonoides y la síntesis de antocianinas, y la chalcona sintasa, la cual es la enzima clave para la síntesis de flavonoides y antocianinas (Figura 34). Además se evaluó el efecto de las altas concentraciones de dióxido de carbono sobre los niveles de transcripción de genes que codifican para las enzimas anteriormente mencionadas, los cuales son: *FaPAL* (síntesis de fenilalanina amonio liasa), *FaC4H* (cinamato-4-hidroxilasa), *Fa4CL* (4-coumaroil:CoA ligasa), *FaCHS* (chalcona sintasa), *FaF3H* (flavanona 3-hidroxilasa), *FaFLS* (flavonol sintasa), *FaDFR* (hidrido flavonol reductasa), *FaANS* (antocianidin sintasa) y *FaLAR* (leucoantocianidin reductasa) (Figura 34).

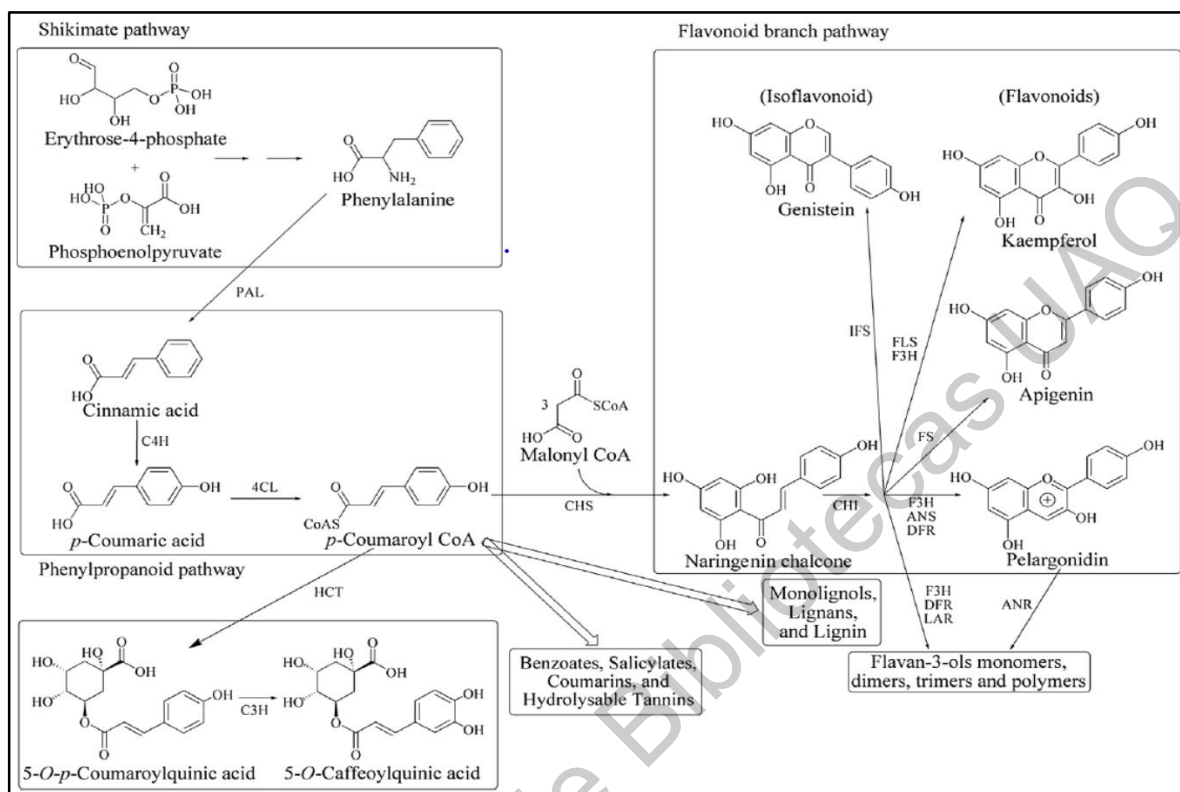


Figura 34. Esquema de las ramificaciones de las rutas de biosíntesis de polifenoles.

Los resultados mostraron un claro efecto de las altas concentraciones de dióxido de carbono, logrando inhibir de manera significativa la actividad de las cuatro enzimas evaluadas de la síntesis de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides. Por otro lado, encontraron una disminución significativa en los niveles de transcritos que codifican para las enzimas de las rutas de síntesis, encontrando una disminución mayormente acentuada en los niveles de transcritos de *FaFLS*, *FaaANR* y *FaDFR* los cuales son de suma relevancia en los pasos finales de la síntesis de flavonoides y antocianinas respectivamente. Por último, se llevó a cabo la evaluación colorimétrica en dicha investigación, obteniendo una reducción significativa de los valores de "a*", correlacionándolos directamente con los niveles de actividad de la ruta de síntesis de compuestos (Figura 34).

Por su parte, Sánchez et al., (2007) evaluaron el efecto del almacenamiento en atmósferas con 20% de dióxido de carbono sobre la expresión de los genes que codifican para las enzimas fenilalanina amonio liasa, chalcona sintasa y estilbeno sintasa, y el contenido de antocianinas totales en uvas de mesa. Los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de RNAm en los tratamientos con dióxido de carbono, respecto a lo obtenido en los tratamientos control y fue correlacionado directamente con una disminución significativa en el contenido de antocianinas totales de hasta 1.63 veces respecto a los tratamientos control.

Harb et al., (2014) evaluaron el efecto de 7 diferentes composiciones de atmósferas controladas: 21% O₂ + 0.03% CO₂, 3% O₂ + 6% CO₂, 3% O₂ + 12% CO₂, 3% O₂ + 18% CO₂, 10% O₂ + 6% CO₂, 10% O₂ + 12% CO₂, 10% O₂ + 18% CO₂ sobre el contenido de antocianinas analizadas por HPLC y la expresión relativa de genes que codifican para proteínas que forman parte de la ruta de síntesis de antocianinas como la chalcona sintasa, flavanona-3-hidroxilasa, antocianidin sintasa y dihidro flavonol reductasa (*VcCHS*, *VcF3H*, *VcANS* y *VcDFR*). Los resultados muestran una reducción significativa de los niveles de transcritos en los tratamientos con altas concentraciones de dióxido de carbono. De igual manera se observó una reducción significativa en el contenido de las antocianinas, principalmente en los tratamientos con concentraciones de CO₂ de 6, 12 y 18 %.

Los resultados mostrados indican el importante papel del dióxido de carbono en la reducción significativa del contenido de antocianinas, lo cual concuerda con lo obtenido por la presente investigación.

6.1.6. Efecto de las atmósferas controladas en el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.

De los resultados obtenidos en los tratamientos evaluados a 10 °C se aprecia un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha y del tiempo de exposición a las atmósferas controladas (Figura 35 y Tabla 17).

Los resultados muestran un incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales conforme transcurrieron los días de almacenamiento poscosecha aumentando su concentración desde 201.21 mg EAG/100 g PF en el día cero de almacenamiento hasta 322.74 mg EAG/100 g PF en el día 15 de almacenamiento poscosecha. Sin embargo, el incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales aunque se presentó de manera constante a través del almacenamiento poscosecha, se redujo de manera significativa a medida que se incrementó el tiempo de exposición a las atmósferas controladas, reduciéndose de manera significativa desde 270.79 EAG/100 g PF en el tratamiento control hasta 265.27 y 246.92 EAG/100 g PF para 3 y 7 días de exposición a las atmósferas controladas. De acuerdo con los resultados, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre las dos composiciones de atmósferas controladas evaluadas, sin embargo, si se observaron diferencias significativas de éstas respecto a lo obtenido en los tratamientos control (Tabla 17). Por otra parte, en frutos almacenados a una temperatura de 1 °C se observan un contenido de fenoles totales estadísticamente menores en comparación con lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (247.93 y 260.99 EAG/100 g PF, respectivamente) durante 15 días de almacenamiento poscosecha.

A partir de los resultados obtenidos para el contenido de flavonoides totales a una temperatura de 10 °C, se observó un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha, la composición de las atmósferas controladas evaluadas y el tiempo de exposición a las atmósferas controladas. La exposición a las atmósferas controladas produjo una significativa reducción el contenido de flavonoides totales, obteniéndose valores de 61.35 y 55.49 mg ECAT/100 g PF para frutos expuestos durante 3 y 7 días a las atmósferas controladas, cantidades significativamente menores a lo obtenido en el tratamiento control (68.52 mg ECAT/100 g PF). De igual manera, a través de la Figura 36 se puede observar una mayor preservación de los flavonoides en los frutos expuestos a la atmósfera controlada 1 (AC1) con un contenido de flavonoides de 63.63 mg

ECAT/100 g PF respecto a lo obtenido en la atmósfera controlada 2 (AC2) con un contenido de 59.94 mg ECAT/100 PF (Tabla 17). Por último, en frutos almacenados a una temperatura de 1 °C se observan un contenido de flavonoides totales estadísticamente menores en comparación con lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (56.54 y 61.79 ECAT/100 g PF, respectivamente) durante 15 días de almacenamiento poscosecha.

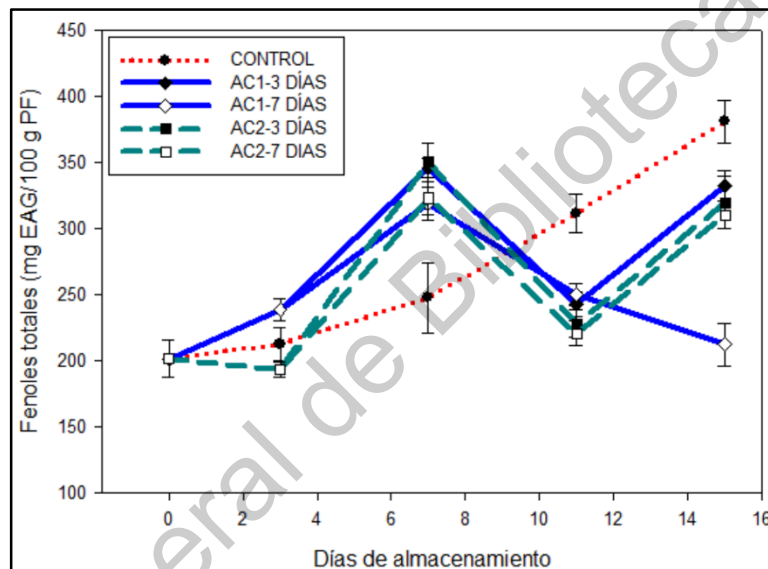


Figura 35. Cambios en el contenido de fenoles totales (mg EAG/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 10 °C.

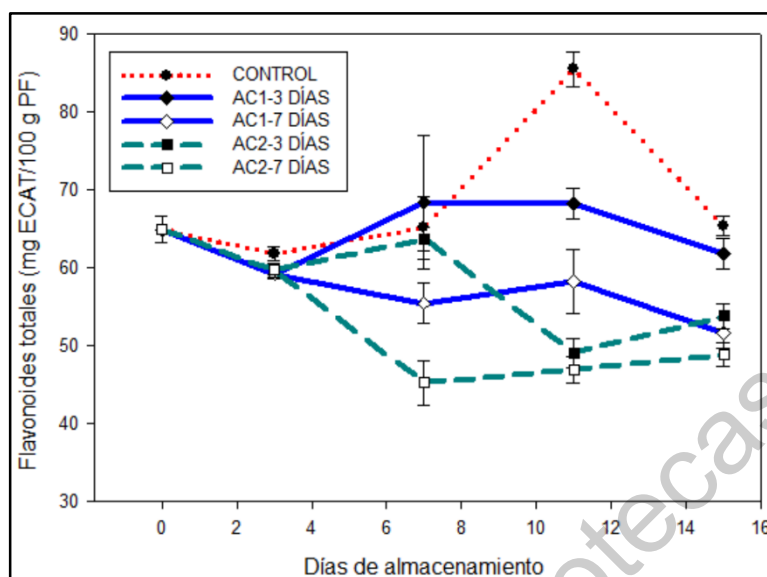


Figura 36. Cambios en el contenido de flavonoides totales (mg ECAT/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 10 °C.

Tabla 17. Comparación de medias del contenido de fenoles totales y flavonoides totales en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Fenoles totales (mg EAG/100g PF)	Flavonoides totales (mg ECAT/100g PF)
1 °C	Control	243.27	55.61
	3 días	251.27	55.75
	7 días	264.66	55.18
10 °C	Control	270.79	68.52
	3 días	265.27	61.35
	7 días	246.92	55.49

Los resultados de la presente investigación coinciden con lo reportado por Bodelón et al., (2010), quienes evaluaron el efecto de atmósferas con 20% O₂ + 20% CO₂ + 60% N₂ por 3 días de exposición de frutos de fresa sobre el contenido de compuestos fenólicos totales.

Estos autores indicaron una disminución significativa en el contenido de compuestos fenólicos totales desde 0.24 g EAG/g PF hasta 0.22 g EAG/g PF bajo condiciones atmosféricas estándar y altas concentraciones de dióxido de carbono, respectivamente.

Harb et al., (2014) evaluaron el efecto de 7 diferentes composiciones de atmósferas controladas: 21% O₂ + 0.03% CO₂, 3% O₂ + 6% CO₂, 3% O₂ + 12% CO₂, 3% O₂ + 18% CO₂, 10% O₂ + 6% CO₂, 10% O₂ + 12% CO₂, 10% O₂ + 18% CO₂ sobre la expresión relativa de genes que codifican para la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides. Como ya se mencionó anteriormente, la expresión de dichos genes se inhibió de manera significativa en frutos sometidos a las altas concentraciones de CO₂. De igual manera se observó una disminución significativa en el contenido ácido clorogénico, ácido p-coumárico, kaempferol y el contenido de catequina.

Además del efecto inhibitorio del dióxido de carbono sobre la actividad de enzimas de las rutas de síntesis de dichos compuestos, se ha propuesto que su disminución se debe de igual manera a procesos de degradación por acción enzimática por la acción de polifenol oxidasa y peroxidasa principalmente, creando un efecto inhibitorio combinado.

Tian et al., (2005) a través de la evaluación de atmósferas controladas de 15% O₂ + 5% CO₂ y 5% O₂ + 5% CO₂. Los resultados mostraron una disminución significativa en el contenido de compuestos fenólicos totales y un incremento significativo en la actividad de polifenol oxidasa y peroxidasa.

6.1.7. Efecto de las atmósferas controladas sobre la capacidad antioxidante por el método ABTS.

La capacidad antioxidante estimada por el método ABTS, mostró diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) en los días de almacenamiento poscosecha y el tiempo de exposición a las atmósferas controladas a 1 °C.

La figura 37 muestra una reducción significativa de la capacidad antioxidante a medida que se incrementa el tiempo de exposición a las atmósferas controladas, respecto a lo obtenido en el tratamiento control, obteniéndose valores de 48.38 y 47.31 % Inhibición de trolox en los frutos expuestos a 3 y 7 días a las atmósferas controladas, valores significativamente menores a lo obtenido en el tratamiento control con un porcentaje de inhibición de trolox del 52.04%. Esta disminución en la capacidad antioxidante en los frutos sometidos a las atmósferas controladas puede estar directamente relacionada con la reducción en el contenido de antocianinas totales, compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en frutos sometidos de igual manera a los tratamientos con atmósferas controladas, disminuyendo de manera significativa la capacidad de inhibir los radicales en la reacción (Tabla 18). De los resultados obtenidos a 1 y 10 °C, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre ambas temperaturas (50.64 y 51.93 % de inhibición de trolox) durante 15 días de almacenamiento poscosecha.

No se observaron diferencias estadísticas significativas en la capacidad antioxidante por el método DPPH y la actividad específica de superóxido dismutasa y catalasa (Tabla 18 y 19), sin embargo, si se observaron diferencias estadísticas significativas entre ambas temperaturas, obteniendo valores significativamente mayores en los frutos almacenados a 1 °C, respecto a lo obtenido en los frutos almacenados a 10 °C (24.61 y 22.51 % inhibición de Trolox, respectivamente).

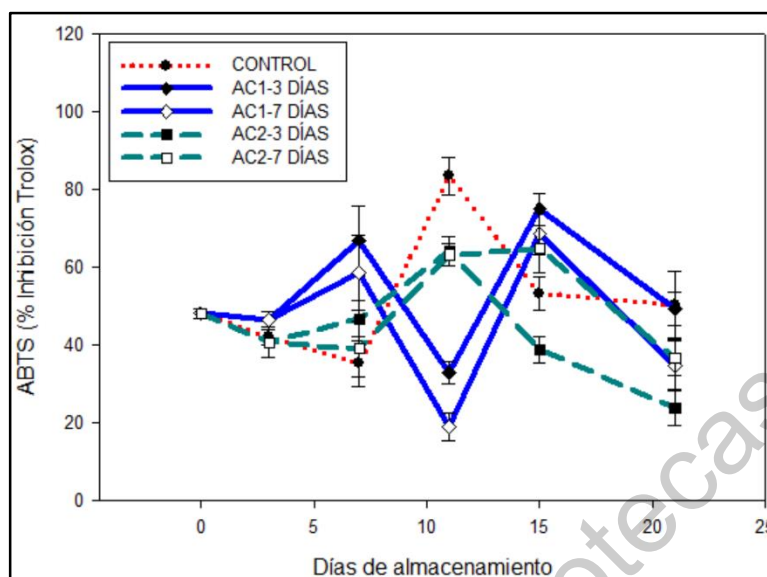


Figura 37. Cambios en la capacidad antioxidante por el método ABTS de frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

Tabla 18. Comparación de medias de la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	ABTS (% Inhibición Trolox)	DPPH (% Inhibición Trolox)
1 °C	Control	52.04 a	24.62 ab
	3 días	48.38 b	21.39 b
	7 días	47.31 b	27.88 a
10 °C	Control	54.43 a	20.77 b
	3 días	52.00 a	21.74 b
	7 días	49.33 a	25.00 a

Tabla 19. Comparación de medias de la actividad de superóxido dismutasa en frutos de zarzamora sometidos a diferentes AC por 3 y 7 días: control en aire, AC1: 15%CO₂ + 10%O₂ y AC2: 15%CO₂ + 5%O₂ durante 21 y 15 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Superóxido dismutasa (USOD/g Proteína)	
1 °C	Control	13150.94	a
	3 días	12907.21	b
	7 días	12748.68	c
10 °C	Control	12769.36	a
	3 días	12855.99	a
	7 días	12433.50	b

Los resultados de la presente investigación coinciden con lo reportado por Bodelón et al., (2010) para frutos de fresa, en donde evaluaron el efecto de atmósferas con 20% O₂ + 20% CO₂ + 60% N₂ por 3 días de exposición sobre la capacidad antioxidante por el método ABTS obteniendo una reducción significativa en la capacidad antioxidante de 13.2 a 10.2 µM equivalentes de Trolox/g PF para los control y tratamientos con dióxido de carbono respectivamente. La reducción en la capacidad antioxidante la relacionaron directamente con la disminución obtenida en el contenido de antocianinas y el contenido de compuestos fenólicos totales como ya se mencionó anteriormente, los cuales son los principales metabolitos del metabolismo secundario para la inhibición de los radicales libres.

Sánchez et al., (2007) evaluaron el efecto de atmósferas con 20% de dióxido de carbono sobre la capacidad antioxidante y el perfil fitoquímico en uvas de mesa. Los resultados mostraron una reducción significativa en la capacidad antioxidante de hasta 1.5 veces en los tratamientos con altas concentraciones de dióxido de carbono respecto a los tratamientos control.

La reducción en la capacidad antioxidante se relacionó directamente con una reducción significativa en el contenido de antocianinas totales así como en los niveles de transcripción de genes que codifican para fenilalanina amonio liasa y chalcona sintasa.

Los resultados coinciden con lo obtenido en la presente investigación.

6.2. Efecto de atmósferas con especies reactivas de oxígeno en la calidad poscosecha de frutos almacenados a 1 y 10 °C.

6.2.1. Efecto de los tratamientos de atmósferas con especies reactivas de oxígeno sobre los Sólidos Solubles Totales, Acidez Total y pH.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) en la evaluación de los tratamientos a 10 °C, se puede observar un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha y el tiempo de exposición a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno. En la Figura 38 se puede apreciar un incremento significativo de los sólidos solubles totales en los frutos sometidos a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno aumentando su contenido desde 8.97 para el tratamiento control hasta 9.50 y 9.66 para los frutos expuestos durante 12 y 24 horas a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno respectivamente. Este incremento en el contenido de SST en los tratamientos con ERO's indica un aumento en la velocidad metabólica de los frutos, y en consecuencia se incrementa la velocidad de senescencia de los frutos lo que podría provocar una significativa reducción en la vida de anaquel de los frutos. De igual manera se observa un incremento en el contenido de sólidos solubles totales a medida que se incrementan los días de almacenamiento poscosecha de los frutos, incrementándose desde 8.58 en el día cero de almacenamiento poscosecha hasta 9.77 a partir del tercer día de almacenamiento poscosecha sin un incremento significativo a partir del día 7 de almacenamiento. El incremento del contenido de SST (°Bx) como ya se mencionó anteriormente, es una respuesta fisiológica del fruto, lo cual forma parte de su naturaleza senescente. Del factor temperatura, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre ambas temperaturas de estudio (9.59 y 9.38% para 1 y 10 °C, respectivamente).

Por último no se observaron diferencias estadísticas significativas de los tratamientos de atmósferas con especies reactivas de oxígeno tanto a 1 como a 10 °C sobre el porcentaje de acidez total y el pH de los frutos (Tabla 20).

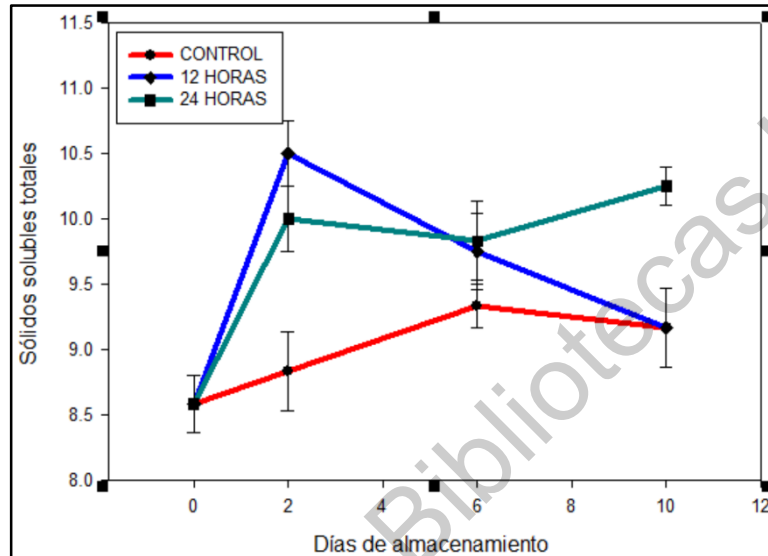


Figura 38. Cambios en los SST de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, seguidas por 10 días de almacenamiento a 10 °C

Tabla 20. Comparación de medias del contenido de SST, AT y pH de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Sólidos solubles totales		Acidez (%)		pH	
1 °C	Control	9.77	b	0.09	a	2.69	a
	12 horas	9.96	a	0.10	a	2.71	a
	24 horas	9.80	a	0.10	a	2.67	a
10 °C	Control	8.97	b	0.10	a	2.78	a
	12 horas	9.50	a	0.10	a	2.74	a
	24 horas	9.66	a	0.10	a	2.74	a

6.2.2. Efecto de las atmósferas con ERO's en la pérdida de peso.

A través de los resultados obtenidos de los tratamientos evaluados a una temperatura de 1 °C se observó un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) tanto de los días de almacenamiento poscosecha así como del tiempo de exposición a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno. En la Figura 39 se puede apreciar una reducción significativa en el porcentaje de pérdida de peso en frutos expuestos a los tratamientos, reduciendo la pérdida de peso desde 7.65% en los tratamientos control hasta 7.37 y 6.86% para las frutillas expuestas a 12 y 24 horas a los tratamientos de atmósferas con especies reactivas de oxígeno respectivamente. De igual manera se observa un incremento en el porcentaje de pérdida de peso a medida que se incrementaron los días de almacenamiento poscosecha de las frutillas, incrementándose desde 2.51% en el día 3 de almacenamiento poscosecha hasta 16.63% en el día 21 de almacenamiento poscosecha, lo cual de igual manera es una respuesta fisiológica de los frutos y lo cual es parte de la senescencia. Sin embargo, como ya se mencionó, se logró disminuir de manera significativa la pérdida de peso en frutos sometidos a los tratamientos de atmósferas con especies reactivas de oxígeno.

No se observaron diferencias significativas tanto para 12 y 24 horas de exposición en los frutos almacenados a una temperatura de almacenamiento de 10 °C (Tabla 21), sin embargo, si se observaron diferencias estadísticas significativas entre ambas temperaturas de almacenamiento, obteniendo un menor porcentaje de peso en frutos almacenados a 1 °C, respecto a lo obtenido en frutos almacenados a una temperatura de 10 °C (4.15 y 7.28%, respectivamente).

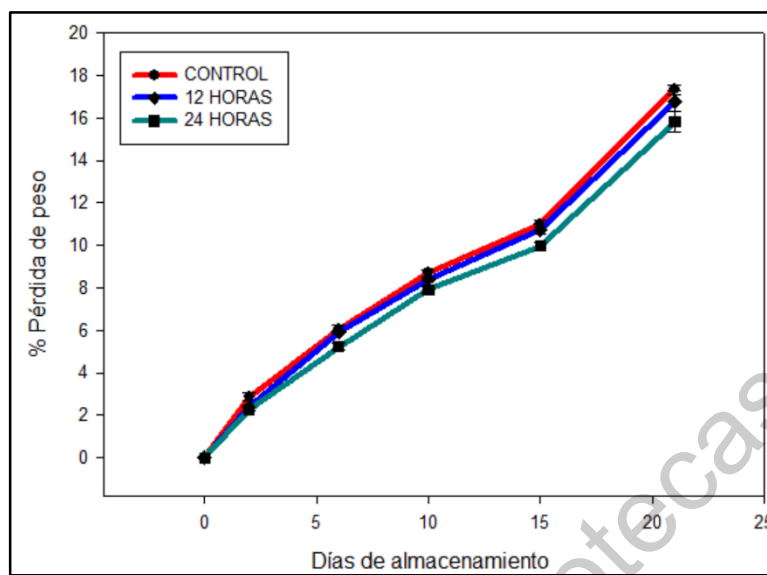


Figura 39. Cambios en el porcentaje de pérdida de peso de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C

Tabla 21. Porcentaje de pérdida de peso de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con especies reactivas de oxígeno (0.07 ppm peróxido de hidrógeno) por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Porcentaje de pérdida de peso (%)	
1 °C	Control	7.65	a
	12 horas	7.37	a
	24 horas	6.86	b
10 °C	Control	6.91	a
	12 horas	8.07	a
	24 horas	6.85	a

6.2.3. Efecto de las atmósferas con ERO's en la tasa de respiración.

De los resultados obtenidos no se observaron diferencias estadísticas significativas de las atmósferas con especies reactivas de oxígeno en la tasa de respiración a 1 y 10 °C (Tabla 22), sin embargo, si se observaron diferencias estadísticas significativas entre ambas temperaturas de almacenamiento,

obteniendo una menor tasa de respiración en frutos almacenados a 1 °C, respecto a lo obtenido en frutos almacenados a una temperatura de 10 °C (13.11 y 69.42 mL CO₂/Kg*h, respectivamente).

Tabla 22. Cambios en la tasa de respiración en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Tasa de respiración (mL CO ₂ /Kg*h)	
1 °C	Control	11.25	a
	12 horas	10.61	a
	24 horas	11.09	a
10 °C	Control	69.95	ab
	12 horas	73.17	a
	24 horas	65.12	b

6.2.4. Efecto de las atmósferas con ERO's en la firmeza y actividades de enzimas de la degradación de la pared celular: poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y celulasa

De la evaluación de los tratamientos de atmósferas con especies reactivas de oxígeno a 1 °C y 10 °C, los resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas de los tratamientos de atmósferas con especies reactivas de oxígeno sobre la firmeza de los frutos, así como en la actividad específica de las enzimas poligalacturonasa, celulasa y pectinmetilesterasa (Tabla 23), sin embargo, si se observaron diferencias estadísticas significativas entre ambas temperaturas de almacenamiento, obteniendo una mayor firmeza en frutos almacenados a 1 °C, respecto a lo obtenido en frutos almacenados a una temperatura de 10 °C (6.32 y 5.30 N, respectivamente), observándose los mismos resultados favorables con una reducción significativa en la actividad específica enzimática tanto para la evaluación de celulasa (4.93 y 5.70 mg glucosa/g proteína*h para 1 y 10 °C, respectivamente) como la evaluación para poligalacturonasa (17.41 y 20.32 mg ác. galacturónico/g proteína*h para 1 y 10 °C, respectivamente) durante 15 días de almacenamiento.

Tabla 23. Comparación de medias de la firmeza y metabolismo de la pared celular en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Firmeza (N)		Poligalacturonasa (mg ácido galacturónico/g proteína*h)		Celulasa (mg glucosa/g proteína*h)	
1 °C	Control	5.85	ab	14.69	a	4.38	b
	12 horas	5.15	b	20.24	b	5.67	a
	24 horas	6.33	a	17.31	c	5.02	ab
10 °C	Control	5.05	a	29.74	a	8.49	a
	12 horas	5.06	a	18.58	b	5.25	b
	24 horas	5.77	a	12.66	c	3.35	c

6.2.5. Efecto de las atmósferas con ERO's en el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas y el color (L, a*, b* y ΔE).

De los resultados obtenidos en la evaluación de los tratamientos a una temperatura de 1 °C se observó un efecto estadísticamente significativo de los días de almacenamiento poscosecha y el tiempo de exposición a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno. La Figura 40 muestra un incremento significativo del contenido de antocianinas monoméricas en las frutillas expuestas durante 24 horas a las atmósferas controladas con valores de 207.39 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF. Sin embargo, el incremento en el contenido de antocianinas monoméricas no fue una respuesta constante en los tratamientos con especies reactivas de oxígeno, debido a que por un lado se obtuvo un incremento en frutos expuestos por 24 horas, sin embargo el contenido de antocianinas monoméricas en frutos sometidos durante 12 horas a los tratamientos fue significativamente menor a lo obtenido en los tratamientos control con valores de 144.47 y 181.62 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF, respectivamente. El incremento en el contenido de antocianinas monoméricas en los frutos expuestos por 12 horas a los tratamientos puede ser debido principalmente a un incremento en el estrés oxidativo en los frutos provocado por las especies reactivas de oxígeno, y a su vez provocando que se presente una mayor síntesis de éstas para poder contrarrestar dicho estrés.

Por otro lado, se observó un contenido de antocianinas monoméricas significativamente menor en frutos almacenados a 1 °C (162.37 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF) respecto a lo obtenido en frutos almacenados a una temperatura de 10 °C (183.07 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g PF) durante 10 días de almacenamiento poscosecha.

Por otro lado, para el contenido de antocianinas poliméricas, de igual manera se observó un efecto estadísticamente significativo de los días de almacenamiento poscosecha y del tiempo de exposición a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno a una temperatura de 10 °C. En la Figura 41 se puede apreciar un incremento significativo en el porcentaje de antocianinas poliméricas a medida que se incrementa el tiempo de exposición a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno, incrementándose desde un 0% de color polimérico en el tratamiento control, hasta valores significativamente mayores de 9.96 y 10.39% para frutos sometidos durante 12 y 24 horas a los tratamientos (Tabla 24). No se observaron diferencias estadísticas significativas del factor de temperatura en el porcentaje de antocianinas poliméricas tanto a 1 como a 10 °C (7.45 y 5.10%).

Como ya se mencionó, el contenido de antocianinas, principalmente el porcentaje de antocianinas poliméricas es un parámetro que afecta en gran medida las características colorimétricas de las frutillas, por lo que si se incrementa el porcentaje de color polimérico se afecta en gran medida la coloración de las frutillas, provocando que estas migren hacia coloraciones rojas, las cuales son indicadores del fenómeno de la reversión de color, el cual es un importante defecto de calidad. Lo anterior se corroboró obteniendo un incremento estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) en el parámetro colorimétrico "a*" en frutillas sometidas a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno a 1 °C. En la Figura 42, se puede apreciar que los valores de a* son mayores en frutillas sometidas durante 24 horas a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno, seguida de las frutillas sometidas por 12 horas y por último se obtuvieron valores más bajos en los tratamientos control, con valores de a* de 0.84, 0.81 y 0.50, respectivamente (Tabla 25).

No se observaron diferencias estadísticas significativas del factor de temperatura en el parámetro colorimétrico “a” tanto a 1 como a 10 °C (0.65 y 0.63) durante 10 días de almacenamiento.

Estos resultados indican que las frutillas viraron hacia coloraciones rojas provocando una importante pérdida en la calidad del producto, esto posiblemente por el incremento en el porcentaje de antocianinas poliméricas, tal y como se observó en los tratamientos con atmósferas controladas.

A partir de los resultados obtenidos, no se lograron obtener diferencias estadísticas significativas de los tratamientos a 1°C como a 10°C sobre los parámetros colorimétricos L, b* y ΔE (Tabla 26). De igual manera, no se observaron diferencias estadísticas significativas del factor de temperatura en el parámetro colorimétrico “L” tanto a 1 como a 10 °C (39.34 y 39.27, respectivamente), para el parámetro colorimétrico “b” tanto a 1 como a 10 °C (6.10 y 6.10, respectivamente) y para el parámetro colorimétrico “Delta E” tanto a 1 como a 10 °C (1.09 y 1.04, respectivamente) durante 10 días de almacenamiento.

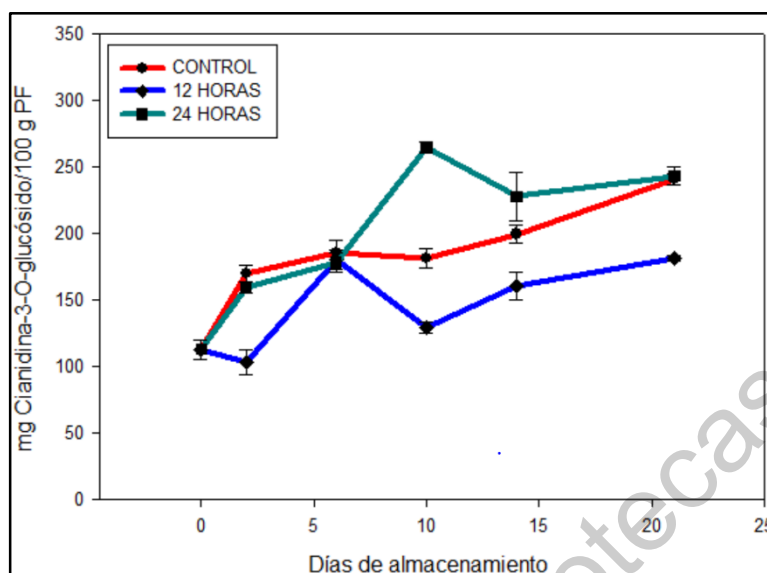


Figura 40. Cambios en el contenido de antocianinas monoméricas (mg cianidina-3-O-glucósido) de frutos de zarzamora sometidos a tratamientos con atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C

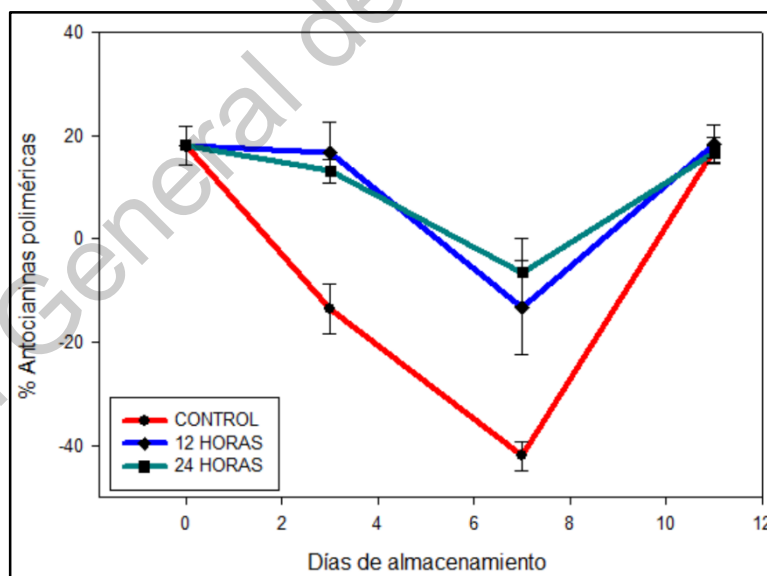


Figura 41. Cambios en el porcentaje de antocianinas poliméricas en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 10 días de almacenamiento a 10 °C

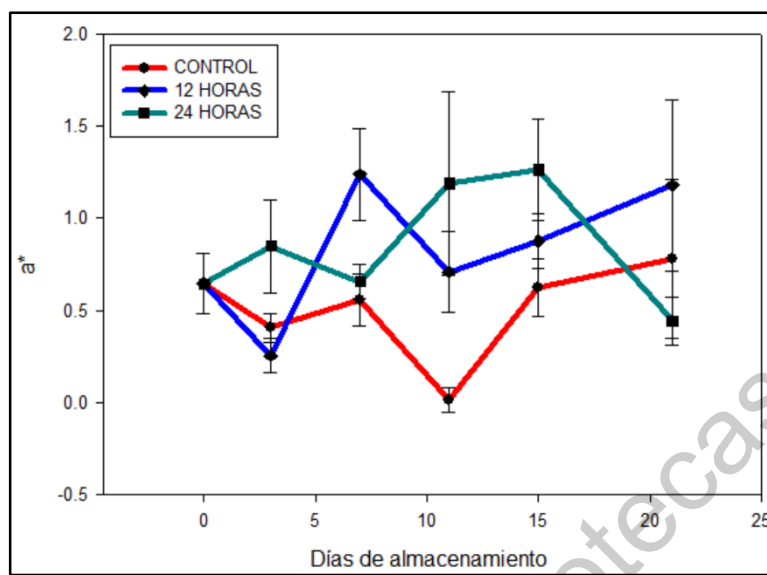


Figura 42. Cambios en el valor de color "a*" de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 10 días de almacenamiento a 10 °C.

Tabla 24. Comparación de medias del contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Antocianinas monoméricas (mg Cianidina-3-O-glucósido/100g PF)		Porcentaje de color polimérico (%)	
		Media	Letra	Media	Letra
1 °C	Control	181.62	a	11.0	a
	12 horas	144.47	b	11.0	a
	24 horas	207.39	c	14.0	a
10 °C	Control	214.51	a	0.00	a
	12 horas	141.78	b	9.96	b
	24 horas	198.78	c	10.39	b

Tabla 25. Comparación de medias de los valores de color de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	L	a*		b*		Delta E (ΔE)		
1 °C	Control	39.88	a	0.50	b	5.99	a	1.60	a
	12 horas	40.04	a	0.81	b	6.02	a	1.79	a
	24 horas	39.89	a	0.84	a	6.06	a	1.64	a
10 °C	Control	39.23	a	0.63	a	6.10	a	1.03	a
	12 horas	39.30	a	0.59	a	6.08	a	1.04	a
	24 horas	39.28	a	0.66	a	6.12	a	1.02	a

6.2.6. Efecto de las atmósferas con ERO's en el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.

Se observó un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha y del tiempo de exposición a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno. La Figura 43 muestra una disminución significativa en el contenido de compuestos fenólicos totales en frutillas sometidas durante 12 horas a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno con un contenido de 247.87 mg EAG/100 g PF, contrario al aumento significativo del su contenido en las frutillas sometidas por 24 horas a los tratamientos con un contenido de compuestos fenólicos de 282.46 mg EAG/100 g PF, sin embargo, el aumento a las 24 horas de exposición no fue estadísticamente diferente a lo obtenido en los tratamientos control con un contenido de compuestos fenólicos totales de 271.32 mg EAG/100 g PF. De igual manera, se observó un efecto estadísticamente significativo del factor temperatura, obteniendo un contenido significativamente mayor en frutos almacenados a 1 °C (257.94 mg EAG/100 g PF), respecto a lo obtenido en frutos almacenados a una temperatura de 10 °C (268.90 mg EAG/100 g PF) durante 10 días de almacenamiento. Por su parte, el contenido de flavonoides totales en la evaluación de los tratamientos a 1 °C, se observó un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) de los días de almacenamiento poscosecha y el tiempo de exposición a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno (Tabla 26).

En la Figura 44 se puede observar un incremento significativo en el contenido de flavonoides totales en las frutillas sometidas a 24 horas a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno con un valor de 51.51 mg ECAT/100 g PF, seguidas de los tratamiento control y de las frutillas expuestas durante 12 horas a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno con valores de contenido de flavonoides de 45.95 y 41.69 mg ECAT/100 g PF (Tabla 26). De igual manera, se observó un efecto estadísticamente significativo del factor temperatura, obteniendo un contenido de flavonoides totales significativamente mayor en frutos almacenados a 1 °C (47.75 mg ECAT/100 g PF), respecto a lo obtenido en frutos almacenados a una temperatura de 10 °C (53.21 mg ECAT/100 g PF) durante 10 días de almacenamiento.

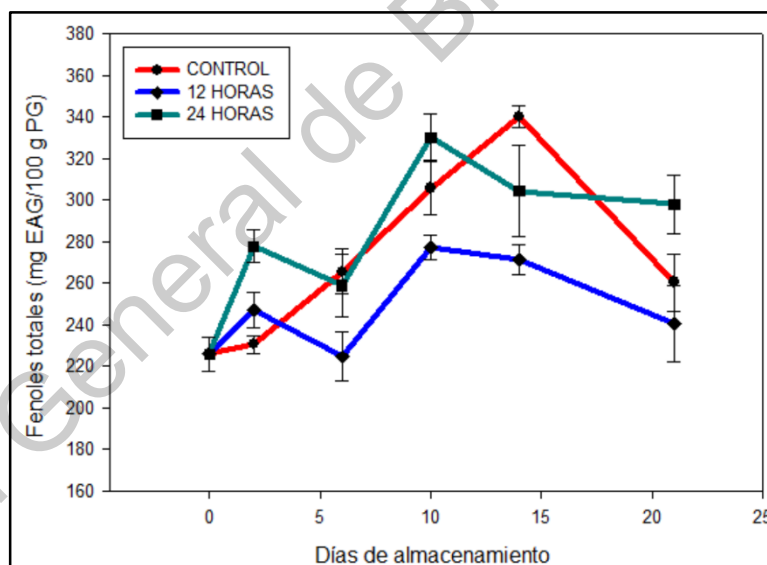


Figura 43. Cambios en el contenido de fenoles totales (mg EAG/100 g PF) de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C

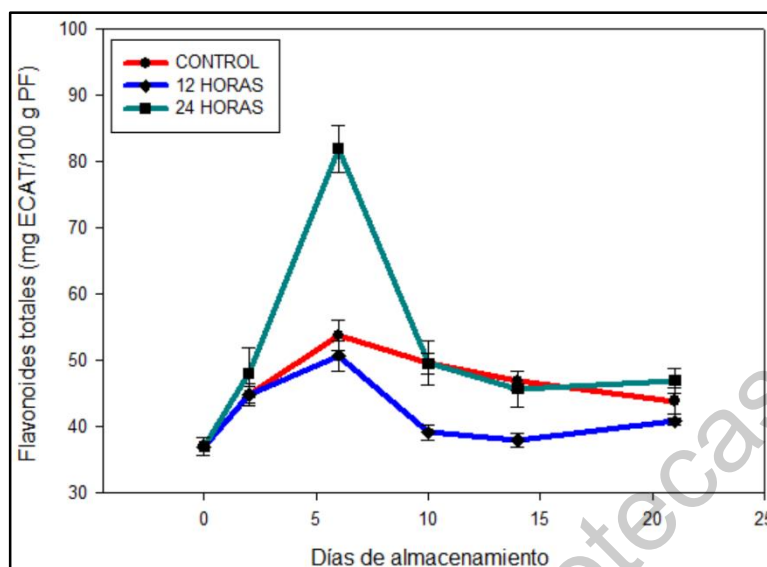


Figura 44. Cambios en el contenido de flavonoides totales (mg ECAT/100 g PF) en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C

Tabla 26. Comparación de medias del contenido de fenoles totales y flavonoides totales en frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Fenoles totales (mg EAG/100g PF)	Flavonoides totales (mg ECAT/100g PF)
1 °C	Control	271.32	45.95
	12 horas	247.87	41.69
	24 horas	282.46	51.51
10 °C	Control	287.37	50.92
	12 horas	249.78	51.81
	24 horas	269.55	56.89

6.2.7. Efecto de las atmósferas con ERO's sobre la capacidad antioxidante por el método ABTS.

A partir de los resultados obtenidos de la evaluación de los tratamientos a 1 °C, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas de los días de almacenamiento poscosecha y del tiempo de exposición a las atmósferas controladas. La Figura 45 muestra una disminución significativa de la capacidad antioxidante en las frutillas sometidas durante 12 horas a las atmósferas con ERO's.

Esta reducción en la capacidad antioxidante se debe principalmente a la reducción significativa que se presentó en el contenido de antocianinas totales, compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en los frutos sometidos a dicho tratamiento. Contrario a lo observado en los frutos expuestos por 12 horas a los tratamientos, en los tratamientos de 24 horas a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno, se observó un incremento significativo de la capacidad antioxidante de hasta 37.66% de inhibición Trolox, el cual es estadísticamente igual a lo obtenido en el tratamiento control con un valor de 36.88% de inhibición Trolox. No se observó una diferencia estadísticamente significativa por efecto del factor temperatura para la capacidad antioxidante por el método ABTS tanto a 1 °C como a 10 °C (39.90 y 39.0% inhibición de Trolox, respectivamente).

Tal y como se observó para los tratamientos de atmósferas controladas, no se observaron diferencias estadísticas significativas de los tratamiento de atmósferas con especies reactivas de oxígeno sobre la capacidad antioxidante por el método DPPH (Tabla 27), sin embargo, se observó un incremento en la capacidad antioxidante por el método DPPH en frutos almacenados a 1 °C (30.72% inhibición de Trolox) respecto a lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (26.70% de inhibición de Trolox).

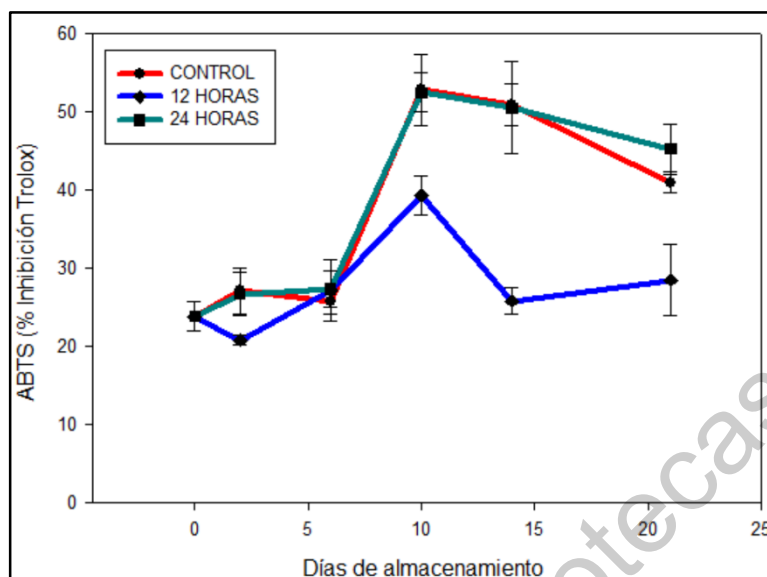


Figura 45. Cambios en la capacidad antioxidante por el método ABTS de frutos de zaramora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas contra tratamiento control en aire, durante 21 días de almacenamiento a 1 °C.

Tabla 27. Comparación de medias de la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH de frutos de zaramora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	ABTS (% Inhibición Trolox)	DPPH (% Inhibición Trolox)
1 °C	Control	36.88 a	37.80 a
	12 horas	27.54 b	33.69 b
	24 horas	37.66 a	31.98 b
10 °C	Control	35.00 a	29.78 a
	12 horas	26.33 b	25.19 b
	24 horas	28.68 b	25.13 b

6.2.8. Efecto de las atmósferas con ERO's sobre la actividad específica de superóxido dismutasa.

La actividad específica de la enzima superóxido dismutasa en frutos de zarzamora almacenados a 1 °C mostró diferencias estadísticas significativas de los días de almacenamiento poscosecha y el tiempo de exposición a las atmósferas controladas. Sin embargo, no se observa un efecto claro de los tratamientos sobre la actividad de dicha enzima, ya que se registró la mayor actividad en frutillas sometidas durante 12 horas a las atmósferas con especies reactivas de oxígeno, con una actividad de 11272.89 USOD/g proteína.

Esto a su vez mostraría que las frutillas sometidas por 12 horas a los tratamientos estarían bajo cierto estrés oxidativo más intenso que las que fueron sometidas durante 24 horas y los tratamientos control, las cuales mostraron una actividad específica de 10,745.88 y 8,881.86 USOD/g proteína, de las cuales se esperaría una mayor actividad enzimática, ya que en estos tratamientos se registraron los mayores contenidos de antocianinas monoméricas, compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, lo cual de igual manera es un indicio de un mayor estrés oxidativo (Tabla 28). Se observó una disminución significativa de la actividad específica de superóxido dismutasa en frutos almacenados a 1 °C (11,010.80 USOD/g proteína*h) respecto a lo obtenido en frutos almacenados a 10 °C (12,401.35 USOD/g proteína*h) durante 10 días de almacenamiento.

Tabla 28. Comparación de medias de la actividad de superóxido dismutasa de frutos de zarzamora sometidos a atmósferas con ERO's por 12 y 24 horas durante 21 y 10 días de almacenamiento a 1 y 10 °C respectivamente.

Temperatura	Tiempo de exposición a las atmósferas controladas	Superóxido dismutasa (USOD/g Proteína*h)	
1 °C	Control	9219.76	c
	12 horas	12622.18	a
	24 horas	11140.96	b
10 °C	Control	17167.69	a
	12 horas	11448.88	b
	24 horas	8587.47	c

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7. CONCLUSIONES

- A través de la aplicación de atmósferas controladas de 15%CO₂ + 10%O₂ (AC1) o 15%CO₂ + 5%O₂ (AC2) se modificó el metabolismo de los frutos, logrando mantener las características de calidad de los frutos hasta por 15 días de almacenamiento a 1 °C.
- Mediante el uso de atmósferas controladas se logró mantener significativamente las características de color deseadas en los frutos, esto gracias a la reducción significativa de la polimerización y degradación de las antocianinas en frutos expuestos por 7 días a las atmósferas controladas sin importar la composición.
- Mediante el uso de atmósferas controladas se logró reducir significativamente el metabolismo de la pared celular, inhibiendo la actividad de enzimas de la degradación de la pared celular, y por consecuencia obteniendo frutos más firmes en frutos expuestos por 7 días a las atmósferas controladas sin importar la composición.
- El uso de atmósferas con especies reactivas de oxígeno, bajo los esquemas estudiados, no mantuvo la calidad ni mejoró la vida de anaquel de los frutos de zarzamora.

8. REFERENCIAS

- Allagulova, C. R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M., & Vakhitov, V. A. (2003).** Review: The plant dehydrins structure and putative functions. *Biokhimiya. Food Chemistry*. 68(9), 1157–1165. <https://doi.org/10.1023/A:1026077825584>
- Alscher, J. D. (1997).** Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(5), 287–296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1997.tb00760.x>
- AOAC. (1990).** AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., 15th*(Volume 1), 136–138.
- Andrews, P. K., & Shulin, Li. (1995).** Cell wall hydrolytic enzyme activity during development of nonclimacteric sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Journal of Horticultural Science*, 70(4), 561–567. <https://doi.org/10.1080/14620316.1995.11515327>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004).** Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Araceli, A.C., Elda, C.M., Edmundo, L.G., Ernesto, G.P., (2007).** Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annum* L.) induced by arachidonic acid dependent of an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 70, 69–76
- Arnal, L., Salvador, A., M. J. (2004).** Efecto del ozono en el mantenimiento de la calidad de Caqui “Rojo Brillante.” *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 6(2), 99–106.
- Arora, a, Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002).** Oxidative stress and oxidative system in plants. *Current Science*, 82(10), 1227–1238.

Ávila Fonseca, F. (2011). *El cultivo de la zarzamora*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Retrieved from [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5082/T18890 AVILA FONSECA, FIDEL MEMORIA.pdf?sequence=1](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5082/T18890_AVILA_FONSECA_FIDEL_MEMORIA.pdf?sequence=1)

Bang, J., Lim, S., Yi, G., Lee, J. G., & Lee, E. J. (2019). Integrated transcriptomic-metabolomic analysis reveals cellular responses of harvested strawberry fruit subjected to short-term exposure to high levels of carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology*, 148, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.003>

Barth, M. M., Zhou, C., Mercier, J., & Payne, F. A. (1995). Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *Journal of Food Science*, 60(6), 1286–1288.

Bartoli, C. G., Simontacchi, M., Tambussi, E., Montaldi, E., & Puntarulo, S. (1999). Drought and watering-dependent oxidative stress : effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L . leaves. *Journal of Experimental Botany*, 50(332), 375–383.

Beattie, J., Crozier, A., & Duthie, G. (2005). Potential Health Benefits of Berries. *Current Nutrition & Food Science*, 1(1), 71–86. <https://doi.org/10.2174/1573401052953294>

Bell, N. C., Strik, B. C., & Martin, L. W. (1995). Effect of Primocane Suppression Date on ' Marion ' Trailing Blackberry . II . Cold Hardiness, 120(1), 25–27.

Bodelón, O. G., Blanch, M., Sanchez-Ballesta, M. T., Escribano, M. I., & Merodio, C. (2010). The effects of high CO₂ levels on anthocyanin composition, antioxidant activity and soluble sugar content of strawberries stored at low non-freezing temperature. *Food Chemistry*, 122(3), 673–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.029>

Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 89(7), 1113–1121. <https://doi.org/10.1080/15216540252774694>

Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>

Brackmann, A., Anese, R. de O., Thewes, F. R., Fronza, D., & Hamann, J. J. (2016). Storability of ‘Tupy’ and ‘Guarani’ blackberries in controlled atmosphere. *Bragantia. Post-Harvest technology*. 75(2), 240–246. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.321>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 28(1): 25-30.

Bushway, L., Pritts, M., & Handley, D. (2008). *Raspberry and Blackberry Production Guide for the Northeast, Midwest, and Eastern Canada*.

Cano, M. P., Hernandez, A., & Ancos, B. D. E. (1997). High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products. *Journal of Food Science*, 62(1), 85–88.

Cortell, J. M., & B.C., S. (1997). Effect of florican number in “marion” trailing blackberry. I. Primocane growth and cold hardiness. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, 122(5), 604–610.

Chandra, A., Nair, M. G., & Iezzoni, A. (1992). Prunus Cerasus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 967–969. <https://doi.org/10.1021/jf00056a001>

Chang, E. H., Lee, J. S., & Kim, J. G. (2017). Cell wall degrading enzymes activity is altered by high carbon dioxide treatment in postharvest 'Mihong' peach fruit. *Scientia Horticulturae*, 225, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.038>.

Daniel, E. M., Krupnick, A. S., Heur, Y. H., Blinzler, J. A., Nims, R. W., & Stoner, G. D. (1989). Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2(4), 338–349. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(89\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0889-1575(89)90005-7)

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57(5), 779–795. <https://doi.org/10.1007/s000180050041>

Deng, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2005). Changes in firmness, cell wall composition and cell wall hydrolases of grapes stored in high oxygen atmospheres. *Food Research International*. 38(7), 769–776. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.003>

del Río, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P., & Corpas, F. J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(5), 557–580. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90150-F](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90150-F)

Dhindsa, R. S., Plumb-dhindsa, P., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 93–101. <https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93>

Duttilleul, C. (2003). Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation. *The Plant Cell Online*, 15(5), 1212–1226. <https://doi.org/10.1105/tpc.009464>

Dutta, S. (2010). *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*. (S. Dutta, Ed.) (Primera ed). Kharagpur, India: CRC Press. Taylor y Francis Group. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Elstner, E. (1997). The Biochemistry of Plant Stress and Disease. *Journal of Historical Sociology*, 13(1), 54–77.

Fernandez-Caballero, C., ERO`sales, R., Romero, I., Escribano, M. I., Merodio, C., & Sanchez-Ballesta, M. T. (2012). Unraveling the roles of CBF1, CBF4 and dehydrin 1 genes in the response of table grapes to high CO₂ levels and low temperature. *Journal of Plant Physiology*, 169(7), 744–748. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.018>

FIRA. (2016). *Panorama agroalimentario. Berries 2016* (Vol. 2016). Retrieved from http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200631/Panorama_Agroalimentario_Avicultura_Carne_2016.pdf

Fonseca, S. C., Oliveira, F. A. R., & Brecht, J. K. (2002). Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: A review. *Journal of Food Engineering*, 52(2), 99–119. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00106-6)

Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355–364. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x>

Francis, F. J. (1989). Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(4), 273–314. <https://doi.org/10.1080/10408398909527503>

Gabler, F. M., Smilanick, J. L., Mansour, M. F., & Karaca, H. (2010). Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 55(2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.09.004>

Giuggioli, N. R., Briano, R., Girgenti, V., & Peano, C. (2015). Quality effect of ozone treatment for the red raspberries storage. *Chemical Engineering Transactions*, *44*, 25–30. <https://doi.org/10.3303/CET1544005>

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (August 2001), 0–13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>

Haliawell, B., Guttridge, J. M. C., Huberman, E., & Barr, S. H. (1999). Book Reviews Free radicals in biology and medicine carcinogenesis : a comprehensive survey . volume 10 , the role of chemical and radiation in the etiology of cancer. *Journal of Free Radicals in Biology of Medicine*, *1*, 331–334.

Harb, J., Saleh, O., Kitemann, D., Neuwald, D. A., Hoffmann, T., Reski, R., & Schwab, W. (2014). Changes in polyphenols and expression levels of related genes in “Duke” blueberries stored under high CO₂ levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(30), 7460–7467. <https://doi.org/10.1021/jf5024774>

Hideg, E. (1998). Photoinhibition of Photosynthesis in Vivo Results in Singlet Oxygen Production Detection via Nitroxide-Induced Fluorescence Quenching in Broad Bean Leaves. *Biochemistry*, *37*(33), 11405–11411. <https://doi.org/10.1021/bi972890>

Hideg, É., Barta, C., Kálai, T., Vass, I., Hideg, K., & Asada, K. (2002). Detection of Singlet Oxygen and Superoxide with Fluorescent Sensors in Leaves Under Stress by Photoinhibition or UV Radiation. *Plant and Cell Physiology*, *43*(10), 1154–1164. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf145>

Hwang, M. H., Kim, J. G., Ahn, S. E., Lee, A. Y., Bae, T. M., Kim, D. R., & Hwang, Y. S. (2014). Potential Role of Pectate Lyase and Ca²⁺ in the Increase in Strawberry Fruit Firmness Induced by Short-Term Treatment with High-Pressure CO₂. *Journal of Food Science*, *79*(4). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12382>

Hussain, I., Roberto, S. R., Fonseca, I. C. B., de Assis, A. M., Koyama, R., & Antunes, L. E. C. (2016). Phenology of “Tupy” and “Xavante” blackberries grown in a subtropical area. *Scientia Horticulturae*, 201(March), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.036>

Imlak, M., Randhawa, M., Hassan, A., Ahmad, N., & Rafique, S. (2017). Effect of Different Concentrations of Carbon Dioxide on Physicochemical Traits of Grapes During Storage. *Journal of nutraceuticals and food science*, 2(1), 1. Retrieved from: <http://www.imedpub.com/http://nutraceuticals.imedpub.com/archive.php>

Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, (217), 755–776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055.Cellular>

Jiang, M., & Zhang, J. (2001). Effect of Abscisic Acid on Active Oxygen Species, Antioxidative Defence System and Oxidative Damage in Leaves of Maize Seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 42(11), 1265–1273. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.04.004>

K. Gupta. (1989). The metabolism of Gallic Acid and Hexahydroxydiphenic Acids in Plants. Part 2., (17), 43.

Ke Danyang, Yahia, E., Hess, B., Zhou, L., & Kader, A. A. (1995). Regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbon dioxide stresses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(3), 481–490.

Krüger, E., Dietrich, H., Schöppl, E., Rasim, S., & Kürbel, P. (2011). Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.12.001>

Lange, D., & Kader, A. (1997). Elevated Carbon Dioxide Exposure Alters Intracellular pH and Energy Charge in Avocado Fruit Tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 122(2), 253–257.

Lee, S. K., & Kader, A. A. (2000). Preharvest and Postharvest factors influencing vitamin C content of horticulture crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20(3), 207–220.

Li, D., Zhang, X., Li, L., Aghdam, M. S., Wei, X., Liu, J., Luo, Z. (2019). Elevated CO₂ delayed the chlorophyll degradation and anthocyanin accumulation in postharvest strawberry fruit. *Food Chemistry*, 285, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.150>

Manning, K. (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, 194(1), 62–68. <https://doi.org/10.1007/BF00201035>

Maxwell, D. P., Wang, Y., & McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8271–8276. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8271>

Miesle, T. J., Proctor, A., & Lagrimini, L. M. (1991). Peroxidase Activity, Isoenzymes, and Tissue Localization in Developing Highbush Blueberry. *Journal American Society of Horticultural Science*, 116(5), 827–830.

Millar, A. H., & Leaver, C. J. (2000). The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria. *FEBS Letters*, 481(2), 117–121. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01976-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01976-1)

Miller, G., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133(3), 481–489. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x>

Montero, T. M., Mollá, E. M., Esteban, R. M., & López-Andréu, F. J. (1996). Quality attributes of strawberry during ripening. *Scientia Horticulturae*, 65(4), 239–250. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(96\)00892-8](https://doi.org/10.1016/0304-4238(96)00892-8)

Navarro, S., Vazquez-Hernandez, M., ERO`sales, R., Sanchez-Ballesta, M. T., Merodio, C., & Escribano, M. I. (2015). Differential regulation of dehydrin expression and trehalose levels in Cardinal table grape skin by low temperature and high CO₂. *Journal of Plant Physiology*, 179, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.02.007>

Noguchi, K., Tsunoda, T., Miyagi, A., Kawai-Yamada, M., Sugiura, D., Miyazawa, S. I., Hasegawa, T. (2018). Effects of Elevated Atmospheric CO₂ on Respiratory Rates in Mature Leaves of Two Rice Cultivars Grown at a Free-Air CO₂ Enrichment Site and Analyses of the Underlying Mechanisms. *Plant and Cell Physiology*, 59(3), 637–649. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy017>

Perkins Veazie, P., & Collins, J. K. (2002). Quality of erect-type blackberry fruit after short intervals of controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 25(2), 235–239. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00025-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00025-X)

Prasad, T. K. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell*, 6(1), 65–74. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.1.65>

R, Re., A, Pellegrini., A, Pannala., M, Yang., C, R. D. (1999). Antioxidant activity applying in improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237.

Robertson, A., & Hall, M. N. (1989). A critical investigation into the Flavognost method for theaflavin analysis in black tea. *Food Chemistry*, 34(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(89\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(89)90033-2)

Robson, C. a, & Vanlerberghe, G. C. (2002). Oxidase Have Increased Susceptibility to Mitochondria- Dependent and -Independent Pathways of Programmed Cell Death. *Plant Physiology*, 129(4), 1908–1920. <https://doi.org/10.1104/pp.004853>

Sanchez-Ballesta, M. T., Romero, I., Jiménez, J. B., Orea, J. M., González-Ureña, Á., Escribano, M. I., & Merodio, C. (2007). Involvement of the phenylpropanoid

pathway in the response of table grapes to low temperature and high CO₂ levels. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.04.001>

Servicio de Información Agroalimentaria Pesquera. (2017). Atlas 2017. *Siap*, 231.

Scandalios, J. G. (1993). Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*, 101(1), 7–12. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.7>

Schuster, B., & Herrmann, K. (1985). Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*, 24(11), 2761–2764. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80722-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80722-0)

Sharpe, D., Fan, L., McRae, K., Walker, B., MacKay, R., & Doucette, C. (2009). Effects of ozone treatment on botrytis cinerea and sclerotinia sclerotiorum in relation to horticultural product quality. *Journal of Food Science*, 74(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01234.x>

Singleton, V., Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybde-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., & Durst, R. W. (2006). Identification of Ellagic Acid in Blackberry Juice Sediment. *Journal of Food Science*, 70(3), 189–197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07124.x>

Ștefănuț, M. N., Căta, A., Pop, R., Moșoarcă, C., & Zamfir, A. D. (2011). Anthocyanins HPLC-DAD and MS Characterization, Total Phenolics, and Antioxidant Activity of Some Berries Extracts. *Analytical Letters*, 44(18), 2843–2855. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.582550>

Strik, B. C., R. Howard, L., Hager, T. J., & Talcott, S. T. (2007). *Berry Fruit, Value-Added Products for Health Promotion. Berry Fruit, Value-Added Products for Health Promotion.* <https://doi.org/http://www.ebib.com>

T. Siriwoharn, R. W. (2004). Polyphenolic composition of marion and evergreen blackberries. *Journal of Food Science*, 69, 233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb06322.x>

Tian, S. P., Li, B. Q., & Xu, Y. (2005). Effects of O₂ and CO₂ concentrations on physiology and quality of litchi fruit in storage. *Food Chemistry*, 91(4), 659–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.038>

Vazquez-Hernandez, M., Navarro, S., Sanchez-Ballesta, M. T., Merodio, C., & Escribano, M. I. (2018). Short-term high CO₂ treatment reduces water loss and decay by modulating defense proteins and organic osmolytes in Cardinal table grape after cold storage and shelf-life. *Scientia Horticulturae*, 234(February), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.020>

Vicente, A. R., Costa, M. L., Martínez, G. A., Chaves, A. R., & Civello, P. M. (2005). Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 38(3), 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.06.005>

Viljakainen, S., Visti, A., & Laakso, S. (2002). Concentrations of organic acids and soluble sugars in juices from nordic berries. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 52(2), 101–109. <https://doi.org/10.1080/090647102321089846>

Wu, X., Jiang, L., Yu, M., An, X., Ma, R., & Yu, Z. (2016). Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during peach fruit ripening and senescence. *Journal of Proteomics*, 147, 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.005>

Zadernowski, R., Naczek, M., & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2118–2124. <https://doi.org/10.1021/jf040411p>

Zhang, C., Xiong, Z., Yang, H., & Wu, W. (2019). Changes in pericarp morphology, physiology and cell wall composition account for flesh firmness during the ripening of blackberry (*Rubus* spp.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 250, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.015>

Dirección General de Bibliotecas UAQ