



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DIRECCIÓN DE POSGRADO**

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

**“Estudio de factores que afectan la resistencia mecánica de  
los frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) durante su  
maduración”**

# **TESIS**

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**M.C.A. Jimena Esther Alba Jiménez**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Edmundo M. Mercado Silva**

C.U. Santiago de Querétaro, Qro.

Junio, 2018



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**"Estudio de factores que afectan la resistencia mecánica de los frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) durante su maduración"**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**Presenta:**

M.C.A. Jimena Esther Alba Jiménez

**Dirigido por:**

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva

Dr. Edmundo M. Mercado Silva  
Presidente

  
Firma

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios  
Secretario

  
Firma

Dra. Dulce Ma. Rivera Pastrana  
Vocal

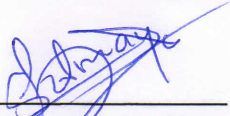
  
Firma

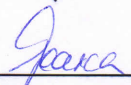
Dr. Crescenciano Saucedo Veloz  
Suplente

  
Firma

Dr. Víctor Hugo Escalona Contreras  
Suplente

  
Firma

  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad

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

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Junio 2018

## RESUMEN

La guayaba es una importante fuente de compuestos bioactivos y funcionales; como ácido ascórbico y compuestos fenólicos. No obstante, es altamente perecedera, sensible al daño por frío y al daño mecánico limitando su vida poscosecha y la comercialización. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del almacenamiento refrigerado en la estabilidad de las membranas así como las aplicaciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en la firmeza de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) cv. 'Media China'. Los efectos de la refrigeración en la estabilidad de la membrana fueron estudiados en lotes de frutos verde-amarillo almacenados a 4, 10 y 20 °C durante diferentes periodos de tiempo; los lípidos de las membranas microsomales fueron separados por CCF y sus ácidos grasos analizados por CG. De forma paralela se hizo un estudio de la resistencia mecánica de los frutos para encontrar el mejor parámetro que la defina. Los efectos en la firmeza de los frutos de las aplicaciones de glicina-Ca en poscosecha, así como de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en pre-cosecha, fueron evaluados durante su almacenamiento; frutos verde-amarillo fueron infiltrados al vacío con glicina Ca durante 10 minutos y almacenados a 10 °C. Para las aplicaciones de Ca en pre-cosecha, se seleccionaron árboles de un huerto comercial con frutos de 5 mm de diámetro a los que se les asperjó, de manera independiente, soluciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  (0, 1, 2 y 3% y 0, 1, 3 y 5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) en tres distintas fechas de desarrollo. Los frutos verde-amarillo fueron cosechados y almacenados a 10 °C para seguir sus cambios de firmeza durante su conservación. Los resultados muestran que el almacenamiento a 4 °C generó pérdida de membranas, fosfolípidos y galactolípidos que estuvieron asociados al desarrollo de daño por frío. El estudio de la resistencia mecánica de los frutos mostró que la deformación no recuperable es el parámetro que mejor expresa los cambios en la firmeza de los frutos. Las infiltraciones de glicina calcio en poscosecha mejoraron la firmeza; mientras que los tratamientos de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en pre-cosecha no mostraron efectos significativos en la firmeza de los frutos. Las

aplicaciones de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  retrasaron el proceso de maduración hasta por 45 días y mantuvieron los frutos más firmes durante su almacenamiento.

Palabras clave: Guayaba, Poscosecha, Firmeza, Membrana Celular.

## SUMMARY

Guava is an important source of bioactive and functional compounds as ascorbic acid and phenolic compounds. However, it is a highly perishable fruit, sensitive to chilling injury and mechanical damage which decrease its postharvest life and marketing. The aim this work was to study the effects of low temperatures on stability of cellular membranes, and the application of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  on firmness of guava (*Psidium guajava* L.) cv. 'Media China'. The effects of low temperatures on stability of cellular membranes were studied on sets of green yellowish fruits stored at 4, 10 and 20 °C during different periods of time; the microsomal membrane lipids were separated by TLC and their fatty acids analyzed by GC. The firmness effects of postharvest applications of glycine-calcium and preharvest application of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  on fruits were evaluated during their storage at 10 °C; mature green stage fruits were infiltrated under vacuum with glycine-calcium during 10 minutes and stored at 10 °C. To observe the effect of preharvest applications of Ca; trees from a commercial orchard were selected using fruits of 5 mm diameter which were sprayed with  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  solutions (0, 1, 2 and 3%, and 0, 1, 3 and 5 mg L<sup>-1</sup>, respectively) at three different maturing stages. The green yellow fruits were harvested and stored at 10 °C to study the firmness changes on the time. The temperature of 4 °C generated loss of membranes, phospholipids and galactolipids contents that were associated with the chilling injury. The postharvest infiltrations of glycine calcium improved the firmness; meanwhile preharvest treatments of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  did not show significant effects on firmness of fruits. The applications of 1 mg L<sup>-1</sup> of  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  delayed 45 days the ripening process and kept the firmness during the storage. The non-recoverable deformation was the best mechanical parameter that describe adequately the changes on fruit firmness and their viscoelastic behavior.

Keywords: Guava, Postharvest, Firmness, Cellular Membrane.

## AGRADECIMIENTOS

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Al proyecto de Cooperación Bilateral México-Chile para fortalecer la investigación en las tecnologías de producción, manejo poscosecha y conservación de frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas con número 204935, por el apoyo recibido para la realización de una estancia de investigación en la Universidad de Chile.

Al Dr. Edmundo Mercado Silva, por la acertada dirección de esta tesis, por su confianza, amistad, comprensión, apoyo y sugerencias para lograr satisfactoriamente todo el trabajo.

A la Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios y la Dra. Dulce María Rivera Pastrana, por su apoyo, sugerencias y correcciones para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Víctor Hugo Escalona Contreras, por su amabilidad y hospitalidad durante mi estancia en el Centro de estudios Postcosecha de la Universidad de Chile (CEPOC), además de su amistad, apoyo, sugerencias y correcciones para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Crescenciano Saucedo Veloz, por su amabilidad y hospitalidad durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), además de su apoyo, sugerencias y correcciones para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Nava Morales, por su apoyo, paciencia, tiempo y asesoría para la realización del artículo científico.

Al Dr. Eduardo García Villanueva, por su apoyo, paciencia y asesorías para la identificación de pectatos de calcio mediante la observación al microscopio óptico.

A la Dra. Paz Robert Canales, por su amabilidad y hospitalidad durante mi estancia en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, además por su apoyo, asesoría, paciencia y gran ayuda durante la fase de análisis del perfil de compuestos fenólicos por HPLC.

A la Dra. Araceli Zavaleta Mancera, por su apoyo y asesorías para trabajar en la unidad de microscopía electrónica.

Al Ing. Leopoldo Mena Torres, por su disposición para realizar el experimento en su huerta y por su apoyo y asesorías en la recolección de muestras.

A la Dra. Elia Nora Aquino Bolaños, por alentarme a seguir con mis estudios de posgrado, además por su amistad y confianza incondicionales.

A la Dra. Silvia Amaya, por sus excelentes tutorías, por brindarme su amistad y apoyo durante mis estudios de doctorado.

A mi esposo Enrique César Covarrubias Báez, por su amor incondicional, su apoyo durante los muestreos tanto en la huerta como en el laboratorio, por su paciencia y por darme ánimos en los momentos más pesados del doctorado.

A mis padres Pablo Rafael Alba Blásquez y Ma. Julia Jiménez Barradas, por su amor incondicional, por apoyarme para seguir con mi preparación profesional, porque siempre han creído en mí y por la gran educación que me han dado. Los amo mucho, gracias.

A mi suegros Manuel Antonio Covarrubias Ramirez<sup>†</sup> y Aurelia Melita Báez Huesca, por su apoyo y amor incondicionales.

A Carmelita, Laurita y Doña Jose que me brindaron su amistad y me apoyaron con toda la parte administrativa en la UAQ.

A Abigahil Soriano Juárez mi amiga incondicional, por estar siempre en las buenas y en las malas, y por darme ánimos cuando entraba en desesperación.

A Brenda, Fidel y mi querido Diego, por su hospitalidad durante mi estancia en el COLPOS, por su apoyo, amistad y cariño.

A mis amigos Manuel, Cris, Estephany, Celene, Gina, Viviana, Mónica, Iris, Patricia, Francisco, Paz, Luis, Rossana, Ana, por su apoyo, amistad y cariño, además de hacer más ligero el camino.

A mis amigas del básquet Odalis, Rosí, Lupita, Ale, Lina y Vania, por brindarme su amistad, confianza y que me hicieron revivir momentos inolvidables al jugar en el equipo de básquet de la Facultad de Química.

A mis amigos Queretanos Lupita, Chelita, Ely, Paty, Brenda, Chachis, Yuki, Alice y Toño por su apoyo, por hacer más ligero el camino y por todas sus enseñanzas, gracias.

A mis compañeros Buzi, Ana Pau, José, Ricardo, Lucía, Dalia, Brianda, Pablo, Eduardo, Adriana y Diana por su apoyo en el laboratorio.

A las chicas de servicio social Sonia, Mary, Rebe, Gris, Liliana, Diana, Melisa, Sandy, Gaby, Michelle y Omar, por su ayuda y dejarse explotar un poquito, gracias.

## DEDICATORIAS

### *A mi esposo*

*Enrique César Covarrubias Báez*

*Por ser mi pilar en todo momento, por siempre demostrarme tu amor y tu apoyo, por escucharme y hacer que me entiendes cuando te hablaba de los términos técnicos del doctorado. Gracias por no dejarme caer e impulsarme siempre a ser mejor persona. Te amo muchísimo corazón. Gracias, gracias, gracias.*

### *A mis padres*

*Pablo Rafael Alba Blásquez y Ma. Julia Jiménez Barradas.*

*Por todo su apoyo y amor incondicional, por dejar que siguiera mi meta sin importar que estaría lejos de ustedes, por nunca dejarme sola, por sus enseñanzas y por confiar en mí.*

*Los amo muchísimo. Gracias, gracias, gracias.*



## ÍNDICE

|                                                                                    |          |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| RESUMEN .....                                                                      | i        |
| SUMMARY .....                                                                      | iii      |
| AGRADECIMIENTOS.....                                                               | iv       |
| DEDICATORIAS .....                                                                 | vi       |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                             | xvi      |
| ÍNDICE DE TABLAS.....                                                              | xx       |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>                                                        | <b>1</b> |
| <b>2. ANTECEDENTES .....</b>                                                       | <b>4</b> |
| <b>2.1 Generalidades de los frutos de guayaba .....</b>                            | <b>4</b> |
| 2.1.1 Origen y distribución .....                                                  | 4        |
| 2.1.2 Descripción taxonómica.....                                                  | 4        |
| 2.1.3 Descripción botánica .....                                                   | 5        |
| 2.1.4 Composición química .....                                                    | 7        |
| 2.1.5 Producción.....                                                              | 9        |
| 2.1.6 Comercialización .....                                                       | 10       |
| 2.1.7 Cambios fisiológicos y bioquímicos durante la maduración de la guayaba. .... | 11       |
| 2.1.8 Manejo de frutos de guayaba para mejorar su calidad.....                     | 14       |
| 2.1.8.1 Efecto de temperatura de almacenamiento .....                              | 14       |
| 2.1.8.2 Pre-cosecha .....                                                          | 15       |
| 2.1.8.3 Poscosecha .....                                                           | 16       |
| <b>2.2 Cambios estructurales durante la maduración de frutos de guayaba.19</b>     |          |
| 2.2.1 Pared celular.....                                                           | 19       |
| 2.2.1.1 Componentes principales de la pared celular .....                          | 20       |
| 2.2.2 Membrana celular .....                                                       | 24       |
| 2.2.2.1 Componentes de la membrana celular .....                                   | 24       |
| 2.2.2.2 Lípidos .....                                                              | 25       |

|                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.2.3 Biosíntesis de los ácidos grasos .....                                                              | 26        |
| 2.2.2.4 Cambios en las membranas celulares durante el almacenamiento                                        | 30        |
| 2.2.2.5 Enzimas de degradación de los lípidos de membrana.....                                              | 34        |
| 2.2.3 Presión de turgor .....                                                                               | 35        |
| <b>2.3 Participación del calcio en el metabolismo del fruto.....</b>                                        | <b>37</b> |
| <b>2.4 Participación del selenio en el metabolismo del fruto.....</b>                                       | <b>41</b> |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>                                                                               | <b>45</b> |
| <b>4. HIPÓTESIS.....</b>                                                                                    | <b>46</b> |
| <b>5. OBJETIVO GENERAL .....</b>                                                                            | <b>47</b> |
| <b>5.1 Objetivos específicos.....</b>                                                                       | <b>47</b> |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                                         | <b>49</b> |
| <b>6.1 Origen, cosecha y manejo de los frutos .....</b>                                                     | <b>49</b> |
| <b>6.2 Estrategia experimental.....</b>                                                                     | <b>49</b> |
| <b>6.3 Métodos.....</b>                                                                                     | <b>52</b> |
| 6.3.1 Aplicación de tratamientos.....                                                                       | 52        |
| 6.3.1.1 Efecto de temperatura de almacenamiento .....                                                       | 52        |
| 6.3.1.2 Tratamiento de frutos con calcio quelado con glicina (Metalosate<br>Calcio) en poscosecha .....     | 52        |
| 6.3.1.3 Tratamiento de frutos con nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) en pre-<br>cosecha ..... | 53        |
| 6.3.1.4 Tratamiento de frutos con selenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) en pre-<br>cosecha .....  | 53        |
| <b>6.4 Diseño experimental .....</b>                                                                        | <b>54</b> |
| 6.4.1 Efecto de temperatura de almacenamiento.....                                                          | 54        |
| 6.4.2 Tratamiento de frutos con calcio quelado con glicina (Metalosate<br>Calcio) en poscosecha.....        | 55        |
| 6.4.3 Tratamiento de frutos con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ en pre-cosecha.....  | 55        |
| <b>6.5 Métodos utilizados .....</b>                                                                         | <b>55</b> |
| 6.5.1 Calidad Visual.....                                                                                   | 55        |
| 6.5.2 Métodos fisiológicos .....                                                                            | 56        |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.5.2.1 Pérdida de peso .....                                                                            | 56        |
| 6.5.2.2 Firmeza de los frutos y análisis de la resistencia mecánica.....                                 | 56        |
| 6.5.2.3 Contenido de Sólidos solubles totales .....                                                      | 57        |
| 6.5.2.4 Acidez titulable .....                                                                           | 58        |
| 6.5.2.5 Índice de maduración (RPI).....                                                                  | 58        |
| 6.5.2.6 Dimensiones internas del fruto.....                                                              | 58        |
| 6.5.2.7 Contenido total de compuestos fenólicos.....                                                     | 59        |
| 6.5.2.8 Capacidad antioxidante.....                                                                      | 60        |
| 6.5.2.9 Perfil de compuestos fenólicos por HPLC .....                                                    | 60        |
| 6.5.3 Métodos bioquímicos. Actividades enzimáticas asociadas al<br>metabolismo de la pared celular. .... | 61        |
| 6.5.3.1 Obtención del extracto enzimático .....                                                          | 61        |
| 6.5.3.2 Actividad de Pectinmetilesterasa (PME) .....                                                     | 61        |
| 6.5.3.3 Actividad de Poligalacturonasa (PG).....                                                         | 62        |
| 6.5.3.4 Cuantificación de proteína.....                                                                  | 63        |
| 6.5.4 Contenido de calcio .....                                                                          | 63        |
| 6.5.5 Análisis histoquímico de Ca.....                                                                   | 63        |
| 6.5.6 Análisis de la integridad de la membrana celular .....                                             | 64        |
| 6.5.6.1 Fuga de electrolitos .....                                                                       | 64        |
| 6.5.6.2 Separación de membranas microsomales .....                                                       | 64        |
| 6.5.6.3 Contenido de proteína en membranas microsomales.....                                             | 65        |
| 6.5.6.4 Contenido de fosfolípidos .....                                                                  | 65        |
| 6.5.6.5 Extracción, separación y cuantificación de lípidos .....                                         | 66        |
| 6.5.6.6 Enzima Fosfolipasa D .....                                                                       | 67        |
| 6.5.6.7 Lipoxigenasa (LOX).....                                                                          | 68        |
| 6.5.6.8 Contenido de malondialdehído (MDA) .....                                                         | 69        |
| 6.5.7 Análisis de enzimas antioxidantes.....                                                             | 69        |
| 6.5.7.1 Catalasa (CAT).....                                                                              | 69        |
| 6.5.7.2 Superóxido dismutasa (SOD).....                                                                  | 70        |
| 6.5.8 Análisis estadístico .....                                                                         | 70        |
| <b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                                                    | <b>71</b> |

|                                                                                                                                           |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>7.1 Efecto de temperatura de almacenamiento .....</b>                                                                                  | <b>71</b>  |
| 7.1.1 Componentes de la membrana celular.....                                                                                             | 71         |
| 7.1.2 Cambio en el perfil de lípidos y ácidos grasos .....                                                                                | 72         |
| 7.1.3 Actividad de fosfolipasa D .....                                                                                                    | 78         |
| 7.1.4 Calidad visual .....                                                                                                                | 79         |
| <b>7.2 Efecto de la aplicación en poscosecha de calcio quelado con glicina (Metalosate Ca) en la resistencia mecánica del fruto. ....</b> | <b>80</b>  |
| 7.2.1 Efectos en la calidad visual .....                                                                                                  | 80         |
| 7.2.2 Cambios en la pérdida de peso y su relación con la firmeza del fruto... 81                                                          |            |
| 7.2.3 Cambios en la firmeza.....                                                                                                          | 84         |
| 7.2.4 Contenido de sólidos solubles totales (SST) y acidez titulable (AT) ... 85                                                          |            |
| 7.2.5 Contenido total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante .... 86                                                            |            |
| 7.2.6 Cambios en el perfil de compuestos fenólicos por HPLC..... 86                                                                       |            |
| 7.2.7 Fuga de electrolitos .....                                                                                                          | 89         |
| <b>7.3 Descripción biomecánica de la guayaba en diferente estado de madurez sometido a relajación. ....</b>                               | <b>90</b>  |
| <b>7.4 Aplicación de <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math> en pre-cosecha.....</b>                                                        | <b>98</b>  |
| 7.4.1 Contenido de calcio en el fruto. ....                                                                                               | 98         |
| 7.4.2 Calidad Visual.....                                                                                                                 | 99         |
| 7.4.3 Cambios en la pérdida de peso.....                                                                                                  | 100        |
| 7.4.4 Análisis de resistencia mecánica.....                                                                                               | 102        |
| 7.4.5 Cambios en el contenido de sólidos solubles totales (SST) y acidez titulable (AT).....                                              | 105        |
| 7.4.6 Cambios en el índice de madurez (Ripening Index; RPI).....                                                                          | 106        |
| 7.4.7 Cambios en la actividad enzimática de pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG). ....                                      | 107        |
| 7.4.8 Observaciones histoquímicas.....                                                                                                    | 108        |
| <b>7.5 Efectos de las aplicaciones pre-cosecha de <math>\text{Na}_2\text{SeO}_4</math> en la vida poscosecha.....</b>                     | <b>112</b> |
| 7.5.1 Calidad visual .....                                                                                                                | 113        |
| 7.5.2 Cambios en la pérdida de peso.....                                                                                                  | 114        |
| 7.5.3 Análisis de la resistencia mecánica.....                                                                                            | 117        |

|                                                                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7.5.4 Cambios en el contenido de sólidos solubles totales (SST) y acidez titulable (AT).....                            | 119        |
| 7.5.5 Cambios en el índice de madurez (RPI).....                                                                        | 120        |
| 7.5.6 Efecto de los tratamientos en la actividad de enzimas relacionadas con la integridad de la membrana celular ..... | 121        |
| 7.5.6.1 Cambios en la actividad de Lipoxigenasa (LOX) .....                                                             | 121        |
| 7.5.6.2 Cambios en el contenido de Malondialdehído (MDA) .....                                                          | 122        |
| 7.5.7 Cambios en las actividades de enzimas antioxidantes .....                                                         | 123        |
| 7.5.7.1 Actividad de catalasa (CAT).....                                                                                | 123        |
| 7.5.7.2 Cambios en la actividad de superóxido dismutasa (SOD) .....                                                     | 125        |
| <b>8. CONCLUSIONES.....</b>                                                                                             | <b>127</b> |
| <b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                                                                             | <b>129</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estructura del árbol de guayabo (A y B), flor (C) y morfología de los frutos (D).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 6  |
| Figura 2. Distribución de la producción de guayaba en México (SAGARPA, 2016).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 10 |
| Figura 3. Precio por kilogramo de fruta de guayaba ‘Media China’ durante el año 2017 (SINIIM). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 11 |
| Figura 4. Patrón de respiración de frutos de acuerdo a sus estados de desarrollo.<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 13 |
| Figura 5. Frutos de manzana con daño por frío. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 14 |
| Figura 6. Modelo estructural hipotético de la pared celular (Fry, 1988). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 20 |
| Figura 7. Microestructura de la membrana celular (Revilla y Zarra, 2000). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 24 |
| Figura 8. Principales reacciones de síntesis de ácidos grasos (Ohlrogge y Browse, 1995). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 27 |
| Figura 9. Ruta procariótica y eucariótica en la biosíntesis de glicerolípidos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 28 |
| Figura 10. Síntesis de triglicéridos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 29 |
| Figura 11. Enzima fosfolipasa A <sub>1</sub> (PLA <sub>1</sub> ) , hidroliza el primer acilo entre el enlace éster y el glicerol; fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ), hidroliza el segundo acilo entre el enlace éster y el glicerol; fosfolipasa C (PLC), hidroliza el enlace éster entre el glicerol y el grupo fosfato; fosfolipasa D (PLD), hidroliza el enlace éster entre el fosfato y el grupo variable. .... | 34 |
| Figura 12. Presión de turgor generada por la vacuola (Hsiao y Liu-Kang, 2000). .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 36 |
| Figura 13. Señalización de la fosfolipasa D y su relación con el etileno en la degradación de la membrana y pérdida de calidad y vida de anaquel (Aghdam <i>et al.</i> , 2012). ....                                                                                                                                                                                                                                             | 41 |
| Figura 14. Síntesis de etileno (Yang y Hoffman, 1984).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 44 |
| Figura 15. Estrategia experimental seguida para el desarrollo de los experimentos de temperatura (A), evaluaciones poscosecha (B) y evaluaciones pre-cosecha (C y D).....                                                                                                                                                                                                                                                        | 51 |
| Figura 16. Reograma de frutos de guayaba sometidos a una prueba de esfuerzo-relajación y parámetros analizados: Carga máxima (CM), Deformación                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|            | recuperable (DR), Deformación no recuperable (DNR), Energía absorbida (EA), Trabajo de carga (TC), Trabajo de descarga (TD).....                                                                                                                                                 | 57 |
| Figura 17. | Dimensiones internas de los frutos con posible influencia en la resistencia mecánica del fruto de guayaba 'Media China'.....                                                                                                                                                     | 59 |
| Figura 18. | Porcentaje relativo de diferentes lípidos de membranas microsomales de frutos de guayaba con severo daño por frío, y almacenados 4 y 10 °C, respecto a frutos sin daño por frío. La línea colocada al 100 % significa el porcentaje relativo de la fruta sin daño por frío. .... | 77 |
| Figura 19. | Actividad de fosfolipasa D en frutos sin daño por frío, frutos con severo daño por frío y almacenados a 4 y 10 °C. ....                                                                                                                                                          | 79 |
| Figura 20. | Apariencia externa de frutos de guayaba almacenados tres semanas a 4 °C (A) y 10 °C (B), y cuatro semanas a 4 °C más 3 días a 20 °C (C).....                                                                                                                                     | 80 |
| Figura 21. | Calidad visual de frutos de guayaba tratados con glicina-calcio almacenados 20 días a 10 °C. ....                                                                                                                                                                                | 81 |
| Figura 22. | Relación entre la firmeza y la pérdida de peso de frutos tratados con glicina-calcio almacenados 20 días a 10 °C.....                                                                                                                                                            | 82 |
| Figura 23. | Cambios en la pérdida de peso de frutos de guayaba tratados con glicina-calcio almacenados 20 días a 10 °C.....                                                                                                                                                                  | 84 |
| Figura 24. | Cambios en la firmeza de frutos de guayaba tratados con diferentes concentraciones de glicina-calcio almacenados 20 días a 10 °C.....                                                                                                                                            | 85 |
| Figura 25. | Cromatograma de fracciones de compuestos fenólicos de frutos de guayaba tratados con quelato de calcio al inicio del almacenamiento.....                                                                                                                                         | 87 |
| Figura 26. | Cromatograma de fracciones de compuestos fenólicos de frutos de guayaba tratados con quelato de calcio a partir de cinco días de almacenamiento. ....                                                                                                                            | 87 |
| Figura 27. | Cambios en la concentración de las fracciones 2 (A), 3 (B), 5 (C) y 8 (D) de compuestos fenólicos en frutos de guayaba almacenados 15 días a 10 °C.....                                                                                                                          | 88 |
| Figura 28. | Curvas de esfuerzo de relajación de frutos de guayaba del mismo estado de madurez sometidos a una deformación de 3 mm durante 180 segundos. ....                                                                                                                                 | 91 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 29. Reogramas obtenidos de pruebas de relajación en frutos de guayaba verde-maduro (A) y amarillo maduro (B). .....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 92  |
| Figura 30. Modelo de Maxwell (A) y Maxwell Generalizado (B) aplicados para describir el comportamiento viscoelástico de frutos de guayaba. Línea roja indica el ajuste del modelo a los datos de la prueba de esfuerzo-relajación. ....                                                                                                                                                     | 93  |
| Figura 31. Calidad visual de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ almacenados 5, 10, y 15 días a $10\text{ }^\circ\text{C}$ y 15 días a $10\text{ }^\circ\text{C}$ más 5 días a $20\text{ }^\circ\text{C}$ . ....                                                                                                         | 100 |
| Figura 32. Cambios en la pérdida de peso de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ almacenados 15 días a $10\text{ }^\circ\text{C}$ y 5 días a $20\text{ }^\circ\text{C}$ . ....                                                                                                                                            | 101 |
| Figura 33. Relación de la pérdida de peso con las propiedades biomecánicas de frutos de guayaba tratados con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en pre-cosecha y almacenados 15 días a $10\text{ }^\circ\text{C}$ y 5 días a $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Carga máxima (A), energía absorbida (B), deformación recuperable (C) y deformación no recuperable (D). .... | 102 |
| Figura 34. Cambios en la carga máxima (A), energía absorbida (B), deformación recuperable (C) y deformación no recuperable (D) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ almacenados 15 días a $10\text{ }^\circ\text{C}$ y 5 días a $20\text{ }^\circ\text{C}$ . ....                                                      | 104 |
| Figura 35. Cambios en la actividad de PME (A) y PG (B) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ almacenados 15 días a $10\text{ }^\circ\text{C}$ y 5 días a $20\text{ }^\circ\text{C}$ . ....                                                                                                                              | 108 |
| Figura 36. Corte histológico del fruto de guayaba 'Media China' mostrando epidermis (E), cavidad multicelular (CA), parénquima (PA) y esclereidas (ES). ....                                                                                                                                                                                                                                | 109 |
| Figura 37. Corte histoquímico de frutos de guayaba teñidos con rojo de rutenio mostrando pectinas en paredes celulares en tratamiento control (A) y tratamiento con 3% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (B). Obsérvese una mayor intensidad en las paredes celulares de los frutos tratados y acumulación interna de pectinas →. ....                                                          | 111 |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 38. Tinción de pectatos de calcio mediante ácido tánico en frutos de guayaba control (A) y tratada con 3% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (B). Se observan pectinas acumuladas al interior de las células →.....                                                                                                                          | 112 |
| Figura 39. Calidad visual de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.....                                                                                                                                                           | 114 |
| Figura 40. Cambios en la pérdida de peso de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. ....                                                                                                                                           | 115 |
| Figura 41. Relación de la pérdida de peso con las propiedades biomecánicas de frutos de guayaba tratados con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ en pre-cosecha y almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. Carga máxima (A), energía absorbida (B), deformación recuperable (C) y deformación no recuperable (D)..... | 116 |
| Figura 42. Cambios en la carga máxima (A), energía absorbida (B), deformación recuperable (C) y deformación no recuperable (D) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.....                                                      | 118 |
| Figura 43. Actividad de CAT de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.....                                                                                                                                                         | 124 |
| Figura 44. Cambios en la actividad de SOD de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. ....                                                                                                                                          | 126 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 1. Taxonomía de guayaba.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 5   |
| Tabla 2. Contenido nutricional de guayaba.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 8   |
| Tabla 3. Gradiente de separación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD.....                                                                                                                                                                                                                        | 61  |
| Tabla 4. Contenido de proteína, volumen de membranas microsomales y contenido de fosfolípidos de frutos de guayaba sin daño por frío (sietes días a 20 °C), con severo daño por frío (4 semanas a 4 °C), y almacenados a 4 y 10 °C por 3 semanas.....                                             | 72  |
| Tabla 5. Contenido de ácidos grasos ( $\text{ng g}^{-1}$ de membranas microsomales) en diferentes fosfolípidos (FL) y galactolípidos (GL) de frutos de guayaba sin daño por frío (sietes días a 20 °C), con severo daño por frío (4 semanas a 4 °C), y almacenados a 4 y 10 °C por 3 semanas..... | 76  |
| Tabla 6. Cambios en las constantes del Modelo de Maxwell Generalizado de frutos de guayaba 'Media China' en dos estados de madurez.....                                                                                                                                                           | 94  |
| Tabla 7. Cambios de las propiedades fisicoquímicas y biomecánicas de frutos de guayaba 'Media China' en dos estados de madurez.....                                                                                                                                                               | 95  |
| Tabla 8. Coeficientes de correlación entre los parámetros biomecánicos, de madurez y geometría del fruto de guayaba.....                                                                                                                                                                          | 96  |
| Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos, biomecánicos y de dimensión del fruto de guayaba en estado verde maduro.....                                                                                                                                 | 97  |
| Tabla 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos, biomecánicos y de dimensión del fruto de guayaba en estado maduro.....                                                                                                                                      | 97  |
| Tabla 11. Contenido de calcio en frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .....                                                                                                                                                     | 99  |
| Tabla 12. Cambios en el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable (AT) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.....                                         | 106 |

|                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 13. Cambios en el índice de madurez (RPI) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. ....                                             | 107 |
| Tabla 14. Cambios en el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable (AT) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C..... | 120 |
| Tabla 15. Cambios en el índice de madurez (RPI) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. ....                                              | 121 |
| Tabla 16. Cambios en la actividad de LOX en frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. ....                                                     | 122 |
| Tabla 17. Cambios en el contenido de MDA en frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. ....                                                     | 123 |

## 1. INTRODUCCIÓN

México ocupa el tercer lugar de producción de guayaba (*Psidium guajava* L.) en el mundo. Se consume principalmente en fresco y es una fuente importante de vitamina A, vitamina C, pectina, fibra dietaria y algunos minerales como fósforo, calcio y hierro, también es rica en antioxidantes como los polifenoles y el ácido ascórbico. No obstante, son frutos altamente perecederos, maduran rápidamente en condiciones ambientales, son sensibles al daño por frío y altamente sensibles al daño mecánico motivado por una alta tasa de ablandamiento que aceleran su pérdida de calidad; y limitan su vida poscosecha lo que dificulta el proceso para su comercialización.

La maduración y senescencia de los frutos está acompañada de diversos cambios fisiológicos y fisicoquímicos. Uno de los principales cambios es la firmeza o ablandamiento, ya que es un parámetro que determina la vida poscosecha y la percepción de la calidad por parte de los consumidores. Hasta el momento, el cambio en la firmeza o ablandamiento se ha asociado principalmente a la acción de enzimas hidrolíticas de la pared celular que provocan una depolimerización de sustancias pécticas y otros polisacáridos hemicelulósicos (Fry, 1995); sin embargo, el ablandamiento es un sistema complejo que puede involucrar diversos mecanismos, tanto el señalado anteriormente, como probablemente otros procesos metabólicos, dentro de los cuales se involucra la degradación y cambios fisiológicos en la membrana celular y sus fosfolípidos, que se asocian a la pérdida de la presión de turgencia celular. Otro factor que puede estar involucrado en la pérdida de firmeza del fruto es la disminución de las concentraciones de calcio extracelular, lo cual puede afectar la funcionalidad de la membrana celular causando alteraciones en la permeabilidad de la misma (Conway *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1995) y favoreciendo la pérdida de agua y por tanto la firmeza del fruto.

Se ha reportado que las aplicaciones de calcio en pre-cosecha, tanto en el suelo como foliares ayudan a mantener la firmeza de los frutos, debido a su capacidad para fortalecer los enlaces con los polisacáridos de la pared celular. No obstante, el calcio es también un elemento de señalización en el metabolismo

celular, así como, es hipotetizado que también ayuda a mantener la estabilidad de las membranas celulares disminuyendo la acción de enzimas involucradas en el catabolismo de los fosfolípidos como las fosfolipasas, esto podría dar una explicación al efecto del retraso de la senescencia (White y Broadley, 2003). Existen diversos factores que afectan la absorción del calcio y la respuesta del fruto a dicho mineral, como el lugar de producción, la variedad, el grado de madurez, entre otros. Sin embargo, la incorporación de un adherente o surfactante puede aumentar la velocidad inicial de absorción, aunque no sea absorbido el contenido total del calcio (Suntharalingam, 1996).

Recientes estudios, han reportado que el selenio es un elemento que ayuda a disminuir la producción de etileno, por la supresión transcripcional de genes como ACS2, ACS4 y ACO1, que codifican para la actividad de las principales enzimas, ACC-sintasa (ACS) y ACC-oxidasa (ACO), que participan en la síntesis de etileno (Zhu *et al.*, 2017), así como también provoca un incremento en enzimas antioxidantes como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GHS-Px), las cuales ayudan a atrapar especies reactivas de oxígeno disminuyendo la peroxidación de las membranas celulares y manteniendo la firmeza de los frutos (Castillo-Godina *et al.*, 2016).

De acuerdo a lo anterior, la presente tesis doctoral aporta conocimiento sobre las aplicaciones de compuestos a base de calcio y selenio en pre-cosecha sobre la funcionalidad y la estabilidad de las membranas celulares en frutos cosechados para determinar cuál es la importancia de este factor en el mantenimiento de la firmeza de los frutos de guayaba 'Media China'.

Los resultados de este trabajo permitieron señalar que las aplicaciones de Ca en poscosecha en forma de quelato de glicina-Ca, tuvo efectos benéficos en la firmeza de la fruta pero las aplicaciones de nitrato de Ca ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) en pre-cosecha no retrasó la pérdida de las propiedades mecánicas ni la calidad de los frutos comparados con los frutos control aunque si se observó un incremento en el contenido de calcio. Las aplicaciones de Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) en pre-cosecha retrasó el desarrollo de los frutos hasta 60 días y mejoró significativamente la resistencia mecánica de los frutos en poscosecha, lo que sugiere que el selenio podría retrasar la peroxidación lipídica de las membranas celulares, manteniendo su

integridad retrasando la pérdida de firmeza y mejorando la calidad de los frutos de guayaba 'Media China'. De igual forma se observó que el almacenamiento a temperaturas por debajo de 8 °C altera la funcionalidad de la membrana y también contribuye a la pérdida de firmeza en los frutos; por lo que la temperatura para almacenar frutos de guayaba debe ser igual o mayor a 10 °C.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de los frutos de guayaba

#### 2.1.1 Origen y distribución

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es originaria de las regiones tropicales de América, y se extiende desde el sur de México hasta los límites de Centroamérica (Mendoza *et al.*, 2005; Pinheiro, 2006). Actualmente se encuentra distribuida en diversas regiones y países del mundo, destacando Estados Unidos, Australia, Filipinas, India, Sudáfrica, Venezuela, Brasil, Egipto, Tailandia e Indonesia (ASERCA, 1996).

En México se podía encontrar en forma silvestre en una gran parte de la región del trópico, donde se aprovechaba como fruta y madera. Esta fruta fue cultivada desde la época prehispánica para el aprovechamiento de su fruta y usos medicinales. En particular en Aguascalientes se cultivaba desde finales del siglo XIX, y fueron esos productores quienes realizaron las primeras selecciones de materiales criollos, que constituyen la base genética de gran parte de las actuales plantaciones comerciales de México (González *et al.*, 2002).

#### 2.1.2 Descripción taxonómica

La guayaba pertenece a la familia *Myrtaceae* que comprende cerca de 150 géneros y 3000 especies, de los cuales el género *Psidium* y la especie *guajava* es el más importante de ésta familia (Pommer y Murakami, 2009). Su clasificación es la siguiente:

**Tabla 1.** Taxonomía de guayaba

---

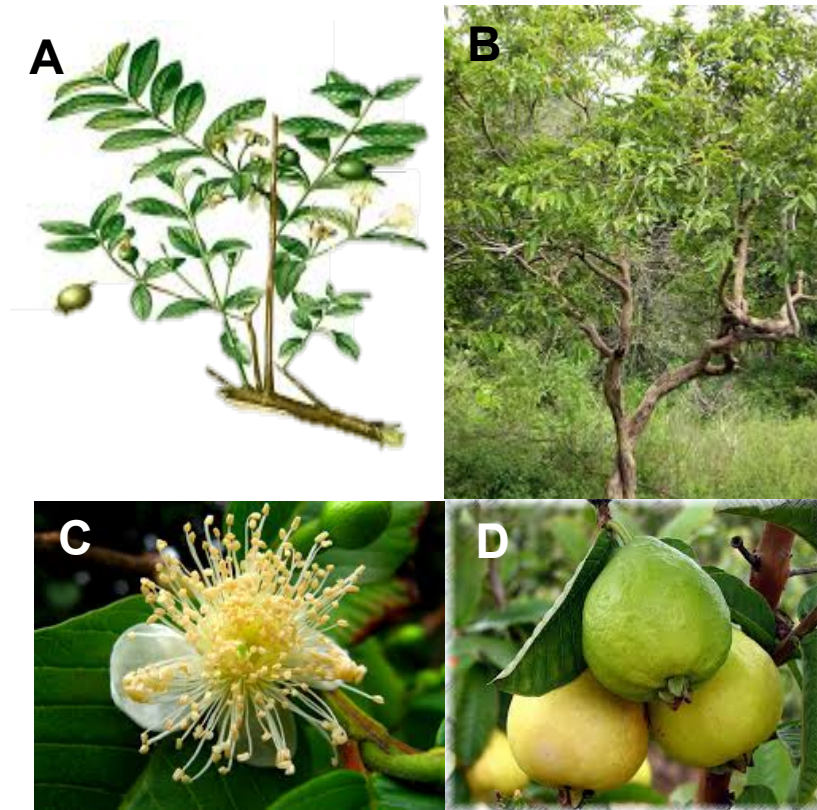
|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| <b>Reino:</b>    | Plantae           |
| <b>Subreino:</b> | Antophyta         |
| <b>Clase:</b>    | Dicotyledonae     |
| <b>Orden:</b>    | Mirtales          |
| <b>Familia:</b>  | Myrtaceae         |
| <b>Género:</b>   | <i>Psidium</i>    |
| <b>Especie:</b>  | <i>Guajava</i> L. |

---

### 2.1.3 Descripción botánica

Los frutos de guayaba crecen en árboles frondosos que alcanzan de 5 a 6 metros de altura, sus hojas nacen en pares, de color verde pálido, de forma alargada, con una longitud en un rango de 10 a 20 cm, con 8 cm de ancho y terminan en forma puntiaguda, posee pelos finos y suaves en ambos lados. El fruto es ovalado, carnoso con múltiples semillas en la pulpa, la cual puede ser de color blanco, crema o rosa, y un peso, que de acuerdo a la variedad, oscila entre 50 y 500 gramos (Figura 1). Su periodo de producción desde la floración hasta su cosecha, es de 100 a 150 días (Yam *et al.* 2010). Se adapta a diferentes altitudes, desde el nivel del mar hasta 1,100 metros; con temperaturas medias anuales de 15.5 °C y 34 °C (Luis *et al.*, 2003).





**Figura 1.** Estructura del árbol de guayabo (A y B), flor (C) y morfología de los frutos (D).

En el mundo existe una amplia diversidad de variedades. En México, la más cultivada y consumida es la variedad 'Media China', que ocupa el 90% de la superficie sembrada. Ésta se caracteriza por tener un alto contenido de células pétreas que al degustarlas le dan una textura arenosa, así como también es de forma oblonga, con cáscara lisa amarilla y con pulpa dulce cremosa blanca. Puede alcanzar un diámetro promedio máximo de 4,5 a 6,0 cm y de 5,0 a 7,0 cm de longitud, pesando de 50 a 90 g (Mercado-Silva *et al.*, 1998; SAGARPA, 2018).

Para obtener frutos de guayaba con buena calidad se prefieren suelos fértiles, profundos, ricos en materia orgánica y bien drenado; con una precipitación media anual óptima entre 1.000 y 3.800 mm, con un manejo adecuado de riegos y programa de podas (Luis *et al.*, 2003). Sin embargo, en la actualidad, las técnicas de cultivo empleada han obtenido pocos resultados en la producción y calidad de los frutos debido a que las técnicas agronómicas de poda, fertilización y riego

principalmente, no han tenido el impacto esperado debido a su mala aplicación o por seguir con técnicas que ya son obsoletas (Padilla *et al.*, 1999).

#### **2.1.4 Composición química**

Los frutos de guayaba destacan por su contenido en vitamina A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), C y provitamina como el caroteno, tiene altos niveles de fibra dietaria así como pectina, fósforo, calcio y hierro (Tabla 2); aunque las semillas no son comestibles éstas contienen ácidos grasos poliinsaturados como omega 6 y omega 3 (Mahendran, 2010; Adsule y Kadam, 1995). Su contenido de vitamina C es 3 a 6 veces más alto (183 mg/100 g) que una naranja (50 mg/100 g) (Hours *et al.*, 2005). Es rica en compuestos antioxidantes, siendo los más abundantes los polifenoles y el ácido ascórbico. Dentro de los polifenoles más importantes en hojas, podemos encontrar miricetina (20.84 mg/100g), quercetina (288.31 mg/100g), luteolina (5.12 mg/100) y kaempferol (9.73 mg/100g) (Vargas *et al.*, 2006); y en fruto, ácido elágico (11.6mg/100g), miricetina (55 mg/100g) y apigenina (58 mg/100g) (Chia-Yun y Mei-Chin, 2012; Miean y Mohamed, 2001). Gorinstein *et al.* (1999), realizaron un estudio sobre el contenido de polifenoles en frutas tropicales y subtropicales, encontrando que la guayaba registró 4.95 mg/100 g de fenoles totales y el mayor contenido de ácido gálico (0.374 mg/100 g). Shirur *et al.* (2013), reportaron que a dichos antioxidantes se les asocian funciones para reducir la incidencia de las enfermedades crónico degenerativas.

**Tabla 2.** Contenido nutricional de guayaba.

| Composición guayaba (Valores para una porción de 100 g). |        |
|----------------------------------------------------------|--------|
| Humedad                                                  | 86.10% |
| Proteínas                                                | 0.8 g  |
| Grasa                                                    | 0.6 g  |
| Carbohidratos                                            | 11.9 g |
| Fibra                                                    | 5.6 g  |
| Calcio                                                   | 20 mg  |
| Hierro                                                   | 0.3 g  |
| Fósforo                                                  | 25 mg  |
| Ácido ascórbico                                          | 183 mg |
| Tiamina                                                  | 0.1 mg |
| Rivoflavina                                              | 0.1 mg |
| Niacina                                                  | 1.2 mg |

Adsule y Kadam, 1995.

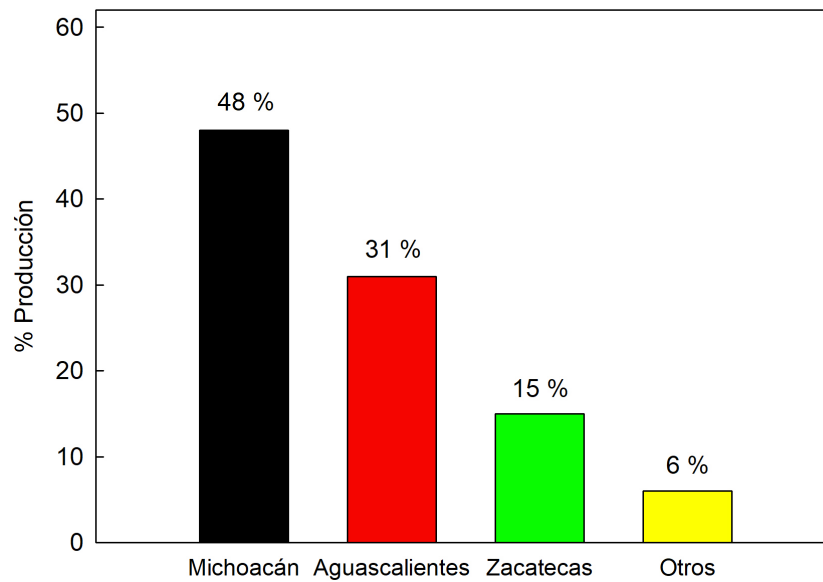
En cuanto al contenido de lípidos existen pocos reportes en los frutos de guayaba. Tasaka *et al.*, (1990) reportaron 67% de ácidos grasos saturados (16:0, 16:1(3t) y 18:0), y 33% de insaturados (18:1, 18:2, y 18:3) en las hojas. Sharaf y El-Saadany (1987), reportaron en jugo de guayaba con diferentes grados de madurez (madurez fisiológica (verde-maduro), madurez de consumo (maduro) y sobremaduro), que los ácidos grasos mayoritarios son el ácido linolénico (C:18:3) con 34,2%, palmítico (16:0) con 27,3%, mirístico (C:14) con 6,2%, cáprico (C:10) con 4,4%, oleico (18:1) con 3,6%, linoléico (C:18:2) y laúrico (C:12) con 3,2%, los cuales cambian durante la maduración. Benito-Bautista (2002), observó que el contenido de ácidos grasos en frutos de guayaba 'Media China' se modifica por efecto de la temperatura de almacenamiento mostrando que en frutos almacenados a temperatura ambiente (20°C-25°C), al alcanzar la madurez de consumo, el 42 % de ácidos estaban representados por ácidos grasos saturados (16:0, 16:1 y 18:0) y el 52% restante por ácidos grasos insaturados (18:1, 18:2 y

18:3); mientras que a una temperatura de 4 °C se presentó un severo daño por frío, los frutos no maduraron de forma normal y presentaron un bajo contenido de ácidos grasos, el cual representó sólo el 52% de los ácidos grasos totales contenidos en un fruto en madurez de consumo, éstos ácidos representaron el 24.6% de saturados y 75.4% de insaturados.

### **2.1.5 Producción**

El mercado mundial de los frutos de guayaba es muy pequeño comparado con el mango y otras frutas tropicales. México ocupa el quinto lugar en producción a nivel mundial con aproximadamente 300,000 toneladas por año, siendo India el principal productor (SAGARPA, 2016). Dentro de los frutales subtropicales y tropicales en cuanto a importancia económica, la guayaba ocupa el 9° lugar nacional, después de aguacate, naranja, plátano, mango, limón, papaya, coco y piña. Actualmente el cultivo ocupa una superficie de 21,510 ha (SAGARPA, 2016).

A nivel nacional y para el año 2016, los principales estados productores fueron Michoacán (147,286 ton), Aguascalientes (94,845 ton) y Zacatecas (46,707 ton) (Figura 2). El valor de la producción fue del orden de los 1,370 millones de pesos (INEGI, 2001; SAGARPA, 2016).



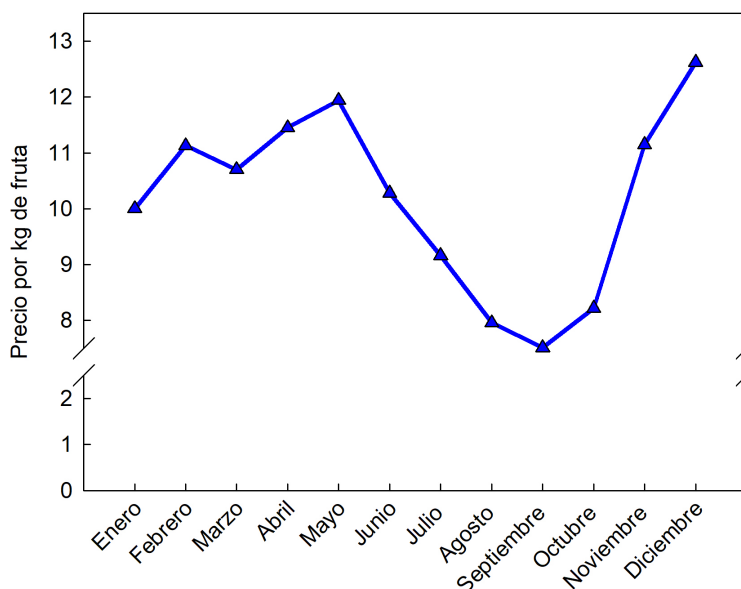
**Figura 2.** Distribución de la producción de guayaba en México (SAGARPA, 2016).

### 2.1.6 Comercialización

Los frutos de guayaba se consumen principalmente en fresco, como fruta de mesa o refresco casero. De esta forma se utiliza del 87 al 92%, mientras que para la industria sólo se utiliza del 8 al 13% (González *et al.*, 2002).

Aunque la disponibilidad de la fruta fresca en México es durante todo el año, el 70% de la producción se presenta entre los meses de septiembre y enero, de los cuales noviembre es el mes de mayor producción, el restante 30% se distribuye del mes de febrero a agosto, siendo los meses de mayo y junio los de menor disponibilidad del producto. El 60% de la producción es destinada a la central de abastos de la ciudad de México para su comercialización y el restante es utilizado para los mercados locales. Los precios por kilogramo de fruta manejados en dichos mercados fluctúan durante todo el año, presentándose el precio más alto al mayoreo durante el mes de diciembre (Figura 3). Un factor de suma importancia que limita su comercialización es su corta vida poscosecha, la cual oscila entre 5 y 7 días a temperatura ambiente o dos semanas (15 d) a 10 °C (Yam *et al.*, 2010), lo que representa muy poco tiempo para su exportación a mercados distantes.

Paralelamente existen para esta fruta fuertes restricciones fitosanitarias que imponen algunos países para su introducción, por lo que su comercio como fruta fresca se ve limitado, ya que del total de la producción únicamente se exporta el 4% (SIAP, 2016). Esto origina una sobre oferta en el mes de noviembre, caída de precios y pérdida de dicha producción; por lo tanto, es necesario buscar alternativas para mejorar el mercado, siendo Estados Unidos un mercado potencial por su cercanía con México (González *et al.*, 2002).



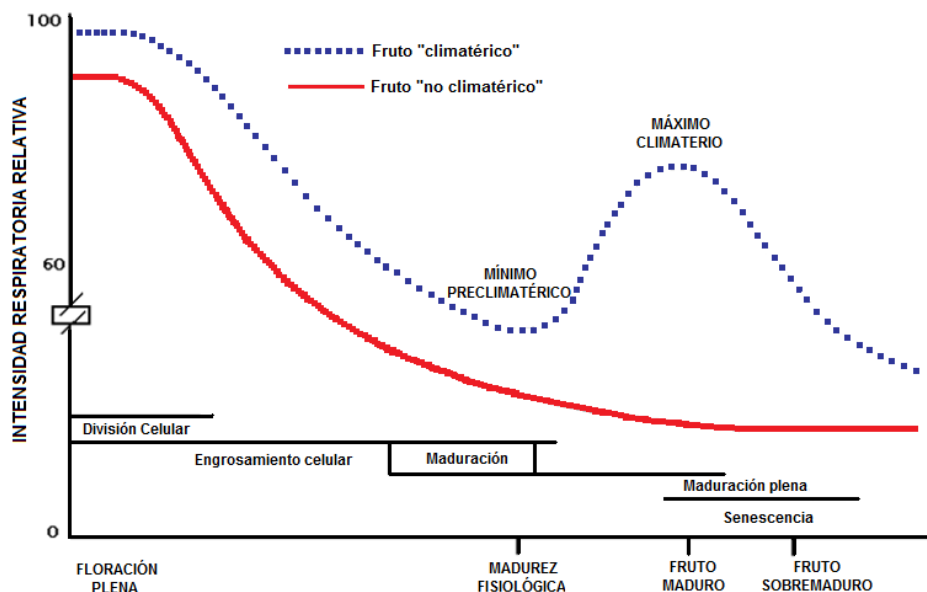
**Figura 3.** Precio por kilogramo de fruta de guayaba 'Media China' durante el año 2017 (SINIIM).

### **2.1.7 Cambios fisiológicos y bioquímicos durante la maduración de la guayaba.**

El desarrollo de los frutos está determinado por varias etapas fisiológicas que van acompañadas de transformaciones bioquímicas, las cuales ocurren de manera continua desde la formación del fruto hasta su cosecha (Gallo, 1996; Tucker *et al.*, 1993).

La respiración es uno de los parámetros más importantes que determinan la actividad metabólica de los productos hortícolas frescos y se relaciona

directamente con su deterioro. Se puede definir como el proceso en el cual las reservas orgánicas como carbohidratos, proteínas, grasas son usadas como sustratos para ser degradados a productos finales simples con una liberación de energía. El oxígeno es usado como aceptor de hidrógenos (en el transporte de electrones) para formar agua y el bióxido de carbono se produce como consecuencia de la oxidación (Kader y Saltveit, 2003). De acuerdo a la producción de CO<sub>2</sub>, los diferentes frutos siguen un patrón, el cual los clasifica en climatéricos y no climatéricos (Figura 4). Los frutos climatéricos son los que maduran acompañados con un incremento en la tasa de respiración (CO<sub>2</sub>), la cual está asociada generalmente con una elevada producción de etileno que disminuye significativamente durante la fase posclimatérica. De acuerdo a sus características fisiológicas los frutos varían en sus tasas de respiración y síntesis de etileno, aunque en forma general se considera que la tasa de respiración es proporcional a la síntesis de etileno, no necesariamente tienen que estar sincronizadas una con la otra. Otra característica importante de éste tipo de frutos es su respuesta a la aplicación de etileno exógeno, el cual al ser aplicado provocan un incremento en la tasa de respiración y velocidad de maduración antes de su periodo normal, siendo proporcional a la concentración de etileno exógeno aplicado (Kader, 2002). Los frutos de guayaba son frutos climatéricos y García-Velasco (1997), demostró la importancia del etileno durante el proceso de maduración; describe que sólo era suficiente el etileno producido por el fruto para que el proceso se llevara a cabo y que la adición o remoción de esta fitohormona del ambiente no cambiaba el patrón de maduración. No obstante, la tasa de respiración varía con la temperatura, mostrando una velocidad de 4 a 30 mL CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 10 °C, la cual incrementó de 10 a 70 mL CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 20 °C.



**Figura 4.** Patrón de respiración de frutos de acuerdo a sus estados de desarrollo.

Como se indicó, un factor importante en el desarrollo y crecimiento de los frutos es el etileno, especialmente en el proceso de maduración. El etileno es una fitohormona que afecta los procesos fisiológicos de las plantas. Esta fitohormona participa en el incremento de la actividad respiratoria y la actividad de diversas enzimas como la poligalacturonasa (PG), peroxidasa (PO), lipoxidasa, amilasas, polifenoloxidasa (PPO) y fenilalaninamonialiasa (PAL); también puede inducir un incremento en la permeabilidad de las membranas y la pérdida de la organización de los componentes de la célula; es fisiológicamente activo en concentraciones muy bajas (menos de 0.1 ppm); durante la maduración de los frutos climatéricos su producción incrementa, así como por daños físicos, enfermedades, aumento en la temperatura hasta 30 °C, y el déficit de agua. Todos estos eventos están relacionados con el proceso de senescencia del cual forma parte la maduración de las frutas (Kader, 2002; Kays y Paull, 2004; Mercado-Silva *et al.*, 1998). En el caso de los frutos de guayaba su producción de etileno a 20 °C varía de 1 a 20  $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Kader, 2002).



## 2.1.8 Manejo de frutos de guayaba para mejorar su calidad

### 2.1.8.1 Efecto de temperatura de almacenamiento

El almacenamiento a baja temperatura es la herramienta más efectiva para extender la vida de anaquel de productos hortofrutícolas, ya que reducen el metabolismo y por tanto su deterioro (Kader, 1999); sin embargo, el metabolismo de frutos tropicales y subtropicales, como la guayaba, se ve alterado cuando se exponen a temperaturas de refrigeración por debajo de 8 °C dando lugar a una disfunción fisiológica conocida como daño por frío. La manifestación de este daño fisiológico es el resultado de la alteración de los procesos metabólicos normales de las células y los tejidos, el cual varía de acuerdo al tejido, la edad fisiológica, su condición metabólica, nivel de exposición a la temperatura crítica de daño, entre otros, y se expresa en diferentes síntomas visuales como lesiones en la superficie, oscurecimiento de los tejidos internos, áreas hundidas, incremento en la permeabilidad de las membranas, deshidratación, alteración del proceso de maduración, senescencia acelerada, cambios en la composición química, baja calidad sensorial y aumento en la sensibilidad a enfermedades (Figura 5). Este fenómeno tiene una alta repercusión en el manejo de los frutos debido a la incertidumbre que se presenta para utilizar la refrigeración en su conservación e incrementar su vida útil (Parkin *et al.*, 1989; Paull, 1990).



**Figura 5.** Frutos de manzana con daño por frío.

Por décadas, se ha propuesto que la principal causa de daño por frío en frutas y vegetales es la teoría de transición de fase de lípidos de la membrana (Lyons,

1973; Raison y Orr, 1990). Se propuso después que las plantas con mayor relación de ácidos grasos saturados e insaturados en sus membranas podrían ser más susceptibles al daño por frío (Whitaker, 1994). En los 90s, Nishida y Murata (1996), reforzaron esta hipótesis por la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas desaturadas en plantas y su reducción de los síntomas de daño por frío. Esta observación fue confirmada por Changfeng y Shiping (2009), reportando que el grado de insaturación de ácidos grasos reduce el daño por frío en duraznos. Recientemente, Li *et al.* (2015b), proponen que el estrés por frío en *Arabidopsis thaliana*, *Atriplex lentiformis* y *Triticum aestivum* genera una respuesta dinámica en el metabolismo de los lípidos de membrana, incluyendo modificaciones en la ruta metabólica de la biosíntesis de lípidos para superar este estrés. Por lo anterior, la temperatura de almacenamiento es un factor importante que podría estar alterando la estabilidad e integridad de las membranas celulares y a su vez la firmeza en los frutos de guayaba.

#### **2.1.8.2 Pre-cosecha**

Las aplicaciones pre-cosecha, tanto en el suelo como en hojas de micro y macro nutrientes tienen efecto benéfico sobre la calidad y almacenamiento poscosecha de los frutos de guayaba, por ejemplo la aplicación de potasio como fertilizante en altas concentraciones (260 g/por árbol) mejoró la calidad de estos frutos manteniendo un mayor contenido en sólidos solubles totales (Kumar *et al.*, 1996; Mitra y Bose, 1985). Un estudio en Brasil mostró que la aplicación de cal sobre suelo ácido antes de plantar los árboles de guayaba 'Paluma', incrementó el contenido de calcio en los frutos, redujo la pérdida de peso y acidez titulable, y mantuvo la firmeza durante el almacenamiento poscosecha (Prado *et al.*, 2005). Por otro lado, Singh y Chauhan (1982), reportaron que la aplicación foliar de nitrato de calcio al 2% o alar (daminozide) en 500 o 1000 mg/L, mejoró la calidad de los frutos de guayaba variedad 'Lucknow-49' reduciendo la pérdida de peso, incrementando la firmeza y retrasando el deterioro cuando los frutos se almacenaron a 27 °C por 8. Así como también, la aplicación foliar de calcio en pre-cosecha, ha logrado mejorar las características de los frutas, minimizar los

fungicidas y proporcionando calcio endógeno. Mandal *et al.*, (2010), demostraron que la aplicación foliar de nitrato de calcio en árboles de guayaba 'Sardar', redujo el deterioro, mantuvo una mejor firmeza, así como el contenido de sólidos solubles y ácido ascórbico durante su almacenamiento poscosecha.

### **2.1.8.3 Poscosecha**

Respecto a los estudios en poscosecha; Glady-Castellano *et al.* (2005), sometieron frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) tanto a inmersiones de CaCl<sub>2</sub> al 2%, como de agua caliente a 45 °C por 5 min y una combinación de ambos tratamientos, posteriormente los frutos fueron almacenados durante 12 días a 10 °C y 20 °C; observando de manera extraña que los frutos almacenados a 10 °C presentaron menor firmeza que los almacenados a 20 °C, aunque los frutos almacenados a 10 °C presentaron una menor pérdida de peso tuvieron la mayor firmeza (6.08 kg/cm<sup>2</sup>) que aquellos tratados con CaCl<sub>2</sub>. Un comportamiento similar fue observado por Mahajan *et al.* (2011), donde los frutos de guayaba de la variedad 'Allahabad Safeda' tratados por inmersión en CaCl<sub>2</sub> al 2% y almacenados durante 4 semanas a 6 °C y 90-95% de humedad relativa, mostraron menor pérdida de peso, una mejor firmeza y alta calidad.

Por otra parte, Fakhouri y Grosso (2003), aplicaron un recubrimiento a base de gelatina y triacetina sobre los frutos de guayaba, logrando mantener los parámetros de la maduración como pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, azúcares, color, textura y además mantuvieron las características organolépticas óptimas para su consumo por un periodo de 20 días a 12 °C. Espinoza-Zamora (2008), utilizó un recubrimiento cereo con 3% de aceite y 1% de sacarosa en frutos de guayaba variedad 'Media China', los cuales presentaron una adecuada calidad sensorial; sin embargo la vida de anaquel no rebasó los 15 días. El quitosano también ha sido utilizado en éstos frutos por inmersión en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 % almacenados a 11 °C por 12 días (Hong *et al.*, 2012), observando que la firmeza disminuyó en los frutos control y los tratados con 0.5 y 1.0 %; sin embargo, en los frutos tratados con 2.0 % de quitosano presentaron valores más altos en comparación con el control, teniendo una

firmeza al final del almacenamiento alrededor de 15 kg/cm<sup>2</sup>. En este estudio, el incremento en la concentración de quitosano redujo el ablandamiento del fruto, y estos autores se lo atribuyen a la alta actividad antifúngica del quitosano, así como, a la cubierta que se forma en la cutícula y lenticelas, por lo cual, se redujo la infección, la tasa de respiración y otros procesos de maduración durante el almacenamiento. Otro recubrimiento que se ha aplicado en frutos de guayaba son las nanopartículas lípido sólidas con goma xantana en concentraciones de 60 a 80 g L<sup>-1</sup>, los frutos tratados se almacenaron por un período de 34 días a 10 °C y posteriormente por 5 días a 25 °C, demostrando que los tratamientos con 60 y 65 g L<sup>-1</sup> mantuvieron mejor la textura con una fuerza de compresión con 14.3 N después de 30 días de refrigeración (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013). Sin embargo, en concentraciones muy altas, las nanopartículas pueden causar daños fisiológicos debido a la naturaleza lipofílica de la cera que cambia la atmósfera interna de la guayaba. Así mismo en este trabajo no se indican datos respecto a la calidad sensorial de los frutos.

Otro tratamiento estudiado es la irradiación ionizante; Singh y Pal (2009), estudiaron frutos de dos diferentes cultivares de guayaba, los cuales se trataron con dosis de 0.25, 0.5 y 1.0 kGy. Los frutos se almacenaron a 27 °C de 5 a 8 días y a 10 °C por 22 días más 5 días a 27 °C; observando que la firmeza disminuyó en todos los frutos almacenados a 27 °C presentando un valor promedio de 8 N y mostrando valores semejantes en los tratamientos almacenados por 22 días a 10 °C más 5 días a 27 °C (10 N). Sin embargo, los beneficios de la irradiación ionizante disminuyen durante el almacenamiento a 10 °C por 22 días, no presentando diferencias entre las frutas tratadas y no tratadas.

Otra de las técnicas utilizadas en poscosecha es el almacenamiento bajo atmósferas controladas (AC). Singh y Pal (2008) estudiaron la aplicación de atmósferas controladas (2.5, 5, 8, y 10 kPa de O<sub>2</sub> con 2.5, 5, y 10 kPa de CO<sub>2</sub>; balance N<sub>2</sub>), aplicadas a las variedades 'Lucknow-49', 'Allahabad Safeda' y 'Apple Colour' almacenadas hasta por 30 días a 8 °C con transferencias periódicas a 25-28 °C, observando que las AC retrasaron o suprimieron los picos climatéricos de respiración y producción de etileno durante la respiración especialmente en atmósferas con menos de 5 kPa de O<sub>2</sub> y que las concentraciones mayores de 5

kPa de CO<sub>2</sub> no fueron benéficas para los frutos. No obstante, estos autores recomendaron atmósferas de 5 kPa O<sub>2</sub> + 2.5 kPa CO<sub>2</sub> ó 5 kPa O<sub>2</sub> + 5 kPa CO<sub>2</sub>, y 8 kPa O<sub>2</sub> + 5 kPa CO<sub>2</sub> que pueden ser aplicadas a estas variedades. También señalaron que las atmosferas de diferente contenido de CO<sub>2</sub> no tuvieron efecto en la retención de firmeza y aunque no indicaron datos de calidad sensorial si señalaron acumulación de metabolitos de fermentación en los frutos mantenidos en la menor concentración de O<sub>2</sub>. A este respecto Benito-Bautista (2002), observó que la aplicación de concentraciones de CO<sub>2</sub> ≥ 10% a frutos de guayaba 'Media China' disminuyó la producción de etileno, mientras que concentraciones de CO<sub>2</sub> ≤ 20% inhibieron totalmente su producción e indicó una alta sensibilidad y producción de sabores extraños en los frutos señalando una limitación importante de la aplicación de esta tecnología en la conservación de esta variedad.

Bassetto *et al.* (2005), aplicaron 1-metilciclopropeno (1-MCP) en frutos de guayaba de la variedad 'Pedro Sato' en concentraciones de 0, 100, 300 y 900 nL L<sup>-1</sup> por 3, 6 y 12 horas a 25 °C y almacenaron los frutos por 12 días de almacenamiento a 25 °C; observaron que los tratamientos no retrasaron los cambios en la firmeza de la pulpa en comparación con el control, a excepción del tratamiento con 900 nL L<sup>-1</sup> por 6 y 12 horas, sin embargo estos frutos no llegaron a su completa maduración. Mientras que Ortiz (2006), reportó que la aplicación de 1-MCP en frutos de guayaba de la variedad 'Media China' de Michoacán con dosis de 0.6, 0.9 y 1.2 mg L<sup>-1</sup> por 1, 3 y 5 horas, y almacenamiento a 10 °C, lograron mantener significativamente su textura y retardando el desarrollo de color, siendo el mejor tratamiento el de 0.6 ppm por 5 h de exposición manteniendo las características visuales de la calidad hasta por 25 días. Por otra parte, Espinoza-Zamora (2008), evaluando el efecto del 1-MCP sobre los compuestos aromáticos de la guayaba 'Media China' encontró que la aplicación de 0.6 ppm de 1-MCP disminuyó drásticamente el área total de los volátiles y sugiere que esta disminución está ligada de manera directa a la acción del etileno y un poco a la baja temperatura de almacenamiento.

De acuerdo con lo anterior, se observa que los resultados de la aplicación de las tecnologías descritas anteriormente, dependen de las variedades estudiadas y que no se ha logrado retener o disminuir los cambios en firmeza durante la

maduración de los frutos de guayaba; esto sugiere que existen varios factores involucrados que aún no son completamente entendidos o explorados, por lo cual es necesario hacer una investigación más profunda de lo que está sucediendo en los frutos.

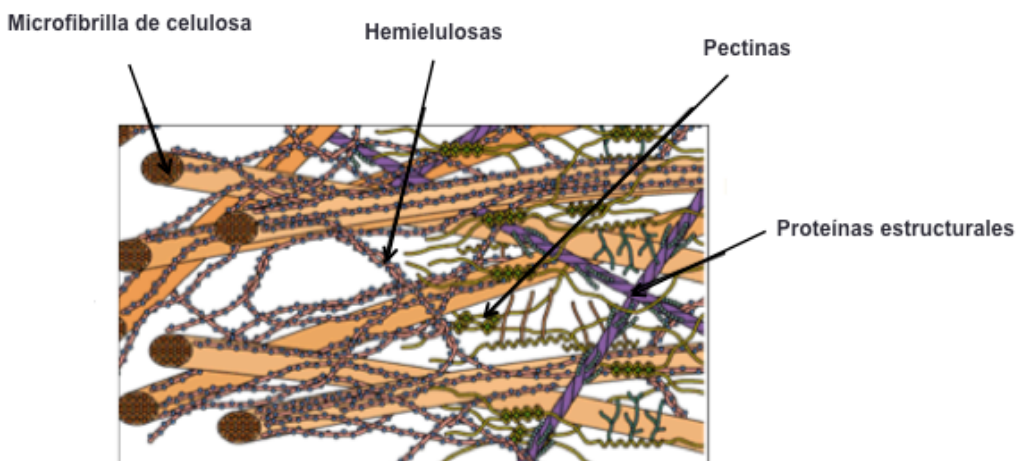
## **2.2 Cambios estructurales durante la maduración de frutos de guayaba.**

La maduración de los frutos de guayaba está caracterizada principalmente por cambios fisiológicos y bioquímicos como la pérdida de color verde, ablandamiento, marchitez y pérdida de brillo. Estos cambios son irreversibles del proceso de senescencia y afectan directamente la calidad y vida de anaquel de los frutos. Entre los cambios más importantes se encuentra la pérdida de firmeza o ablandamiento, ya que es uno de los principales parámetros que define la calidad interna y externa de los frutos. Las principales contribuciones al conocimiento del ablandamiento se han dirigido al estudio de los cambios asociados a la acción de enzimas hidrolíticas de la pared celular, así como los cambios fisiológicos en la composición de la membrana celular y en una menor medida la pérdida de la presión de turgencia en los tejidos del fruto (Marin *et al.*, 2002).

### **2.2.1 Pared celular**

La pared celular de las plantas es una estructura que determina la forma de las células y las mantiene unidas, dando fuerza mecánica y rigidez, actúa como barrera al ataque de patógenos. La pared celular primaria (característica de las células en crecimiento) es una red de microfibrillas de celulosa (donde regiones altamente cristalinas alternan con regiones menos organizadas) embebida en una matriz hidrofílica de hemicelulosas y pectinas (Cosgrove, 1998). En plantas dicotiledóneas, la composición general de la pared celular primaria es aproximadamente de 30% de celulosa, 30% de hemicelulosas, 35% de pectinas y 5% de proteínas estructurales (Figura 6), aunque en paredes celulares de frutos el contenido de pectinas puede ser sustancialmente mayor y el de proteínas menor (Knee y Bartley, 1981; Fry, 1988). Tanto su estructura como su composición y sus

propiedades cambian a lo largo de la vida de la célula. Estos cambios se deben principalmente a la solubilización progresiva y depolimerización de las sustancias pécticas, así como a la acción de una gran cantidad de enzimas sobre la misma (Marin *et al.*, 2002).



**Figura 6.** Modelo estructural hipotético de la pared celular (Fry, 1988).

### 2.2.1.1 Componentes principales de la pared celular

**Celulosa:** es un polímero lineal formado por residuos de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, representa uno de los más abundantes componentes de las plantas intactas. Estos glucanos lineales se asocian entre sí mediante enlaces por puente de hidrógeno para formar microfibrillas de al menos 36 cadenas de glucano. La celulosa otorga resistencia mecánica a la pared celular vegetal. Las microfibrillas de celulosa involucran un núcleo altamente cristalino rodeado por regiones cristalinas y menos interrumpidas por formas amorfas de la celulosa (Cybulska *et al.*, 2013).

**Hemicelulosas:** Estas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos flexibles y unidos fuertemente a través de enlaces por puente de hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de la celulosa (Varner y Lin, 1989). Las hemicelulosas pueden unirse a dos microfibrillas de celulosa adyacentes de tal manera que forman una red y evita el contacto directo entre las mismas.

En la mayoría de las plantas, la hemicelulosa más abundante es del tipo **xiloglucano**, un polisacárido constituido por residuos de D-glucosa con uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), al igual que la celulosa, pero sustituido de forma regular por cadenas cortas laterales de  $\alpha$ -D-xilosa,  $\beta$ -D-galactosa y  $\alpha$ -L-fucosa en el carbono 6 de los residuos de glucosa del esqueleto de glucano (Fry, 1988). Otras hemicelulosas menos abundantes son los xilanos (formados por un esqueleto de D-xilosa en uniones  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), el cual puede contener ramificaciones de arabinosa u otros azúcares); los glucomananos y los galactomananos (Fischer y Bennet, 1991).

**Pectinas:** constituyen un extenso grupo de polisacáridos heterogéneos cuya estructura básica está formada por moléculas de ácido D-galacturónico, unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -D- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), en la cual algunos de los carboxilos pueden estar esterificados con grupos metilos o formar sales (Christensen, 1986). Existen dos clases principales de sustancias pécticas: los ácidos pectínicos, los cuales contienen pequeñas proporciones de ácido poligalacturónico esterificado, y los ácidos pécticos, que tienen sólo moléculas de ácido poligalacturónico libre sin esterificación. Las pectinas son los polisacáridos más solubles de la pared celular, siendo las más importantes en ésta:

- **Homogalacturonanos:** son polímeros lineales formados por residuos de ácido D-galacturónico en uniones  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4, en el cual el grupo carboxilo del C6 puede estar esterificado con un grupo metilo. El proceso de de-esterificación permite que las pectinas formen geles hidratados, en los cuales los grupos carboxílicos de moléculas de homogalacturonanos vecinas se unen iónicamente a través de puentes de  $\text{Ca}^{+2}$  en intervalos regulares (Waldron *et al.*, 2003).
- **Ramnogalacturonanos I (RG I):** son pectinas muy abundantes constituidas por un esqueleto grande de subunidades repetidas de disacáridos (1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -L-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-galacturónico, con largas cadenas de arabinanos y arabinogalactanos unidos a los residuos de ramnosa (Waldron *et al.*, 2003).



- **Ramnogalacturonanos II (RG II):** son heteropolímeros altamente complejos que están formados por un esqueleto de (1→4)- $\alpha$ -D-galacturónico, como los homogalacturonanos, pero con complejas cadenas laterales integradas por varios tipos de azúcares neutros. Éstos se encuentran en menor proporción en la pared celular, sin embargo, su complejidad sugiere que podrían tener otras funciones además de la estructural, que pueden actuar como moléculas de señalización celular (Waldron *et al.*, 2003).

A la degradación de la pectina se le ha atribuido un papel importante en el proceso de ablandamiento de los frutos. La poligalacturonasa (PG) y la pectinmetilesterasa (PME) son enzimas claves involucradas en la degradación de los polisacáridos de ésta, sin embargo, también están involucrados la degradación de los demás componentes de la pared celular.

**Proteínas estructurales:** la pared celular vegetal contiene varias de éstas proteínas, las cuales se clasifican de acuerdo a su composición predominante de aminoácidos, por ejemplo, las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en glicina, proteínas ricas en prolina. Estas proteínas varían en gran medida dependiendo del tipo de célula, del estado de desarrollo y la estimulación previa que haya recibido la planta (heridas, ataque por patógenos, entre otros.) (Cosgrove, 1998).

El modelo de arreglo tridimensional de la pared celular vegetal primaria está formada por microfibrillas de celulosa recubiertas y entrecruzadas por las hemicelulosas de la matriz, principalmente por xiloglucano, las cuales se une fuertemente a la celulosa a través de puentes de hidrógeno. Las moléculas de hemicelulosas pueden unir distintas microfibrillas de celulosa adyacentes, actuando como puente y contribuyendo a que las mismas se mantengan unidas. Las otras hemicelulosas, como xilanos, glucomananos y galactomananos están presentes en cantidades menores y se entrecruzan a las microfibrillas mediante

puentes de hidrógeno, aunque de forma más débil que el xiloglucano. Los espacios en la red de celulosa/matriz de glicano están rellenos por pectinas altamente hidratadas, las cuales también forman una red que se mantiene unida por enlaces covalentes del tipo éster, por enlaces por puente de hidrógeno y por interacciones de tipo iónico. Las redes de celulosa/matriz de glicano y de pectinas podrían mantenerse unidas por enlaces covalentes entre algunas moléculas de xiloglucano y pectinas. Adicionalmente, las proteínas estructurales podrían formar otra red (Carpita y McCann, 2000).

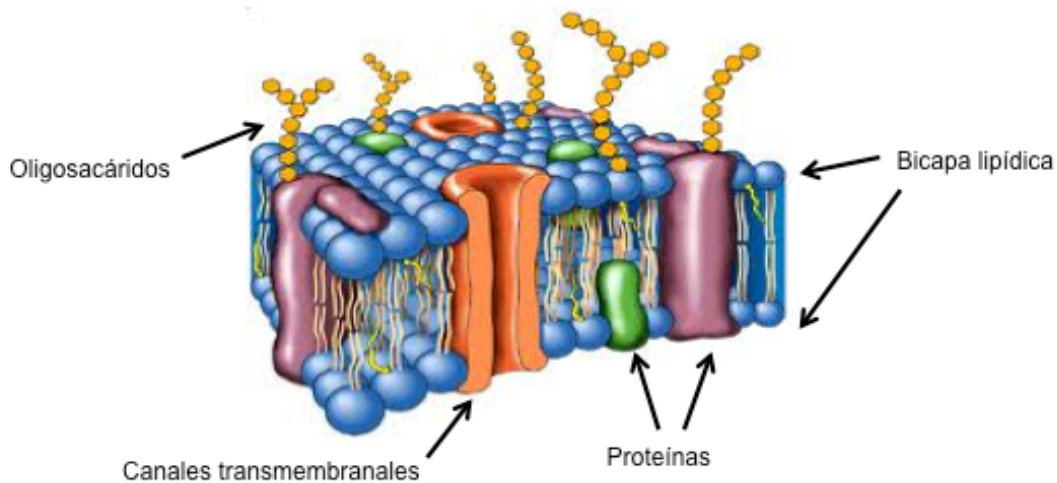
El estudio del ablandamiento se ha dirigido principalmente a la degradación de los polisacáridos de la pared celular, ya que su solubilidad incrementa y su grado de polimerización disminuye directamente conforme la firmeza de los frutos decrece, así como la actividad de las enzimas degradadoras incrementa (Marin *et al.*, 2002). Con respecto a esto, Abu-Goukh y Bashir (2003), reportaron que durante la maduración de frutos de guayaba la firmeza disminuyó, mientras que incrementó la actividad de PG y PME. Sin embargo, Ali *et al.* (2004), al estudiar el ablandamiento en diferentes frutos tropicales, reportaron que éste fenómeno, no sólo se puede atribuir a la modificación del contenido de pectina de la pared celular ni a la actividad de la enzima PG, ya que en cuanto al contenido de pectina en mango 'Harumanis' decrece (429 a 294 mg g<sup>-1</sup>), mientras que en guayaba 'Kampuchea' se mantiene (119 a 120 mg g<sup>-1</sup>) y sus actividades de la enzima poligalacturonasa son muy similares (1.4 nkatal g<sup>-1</sup> en mango y 1.8 nkatal g<sup>-1</sup> en guayaba), lo cual no correlaciona con la pérdida de firmeza ya que en mango la firmeza es menor en comparación con los frutos de guayaba.

Los estudios anteriores muestran que aún no se ha logrado esclarecer el mecanismo de ablandamiento de los frutos, ya que dicho ablandamiento también podría depender del estado de madurez así como de la variedad. Por lo tanto es necesario hacer el estudio dirigido hacia los frutos variedad 'Media China' y corroborar los estudios anteriormente mencionados sobre la pérdida de integridad de pared celular, además de proponer el estudio de la membrana celular, ya que es otro de los factores involucrado en el ablandamiento de los frutos (Marin *et al.*, 2002), con el fin de esclarecer y corroborar la relación de dichos cambios con el ablandamiento en estos frutos.

## 2.2.2 Membrana celular

### 2.2.2.1 Componentes de la membrana celular

La membrana celular es una barrera que separa a la célula vegetal de su entorno, permitiendo que las funciones de la célula se realicen adecuadamente. La membrana está compuesta de lípidos, principalmente fosfolípidos y glicolípidos, y proteínas (Figura 7) que están unidos por enlaces covalentes (Karp, 2010; Revilla y Zarra, 2000). Su función principal es la permeabilidad selectiva ya que le permite seleccionar moléculas que deben entrar y salir de la célula. De esta forma se mantiene estable el medio intracelular, regulando el paso de agua, iones y metabolitos, y a su vez mantiene el potencial electroquímico (Revilla y Zarra, 2000).



**Figura 7.** Microestructura de la membrana celular (Revilla y Zarra, 2000).

Otra de sus funciones importantes es su respuesta a señales externas, ya que tienen receptores que reconocen y responden a dichas señales, haciendo que la membrana genere o inhiba sus actividades internas; así como también media interacciones entre células y es fundamental durante la fotosíntesis, cuando los pigmentos unidos a la membrana absorben la energía de la luz solar, la convierten en energía química y la almacenan en carbohidratos (Karp, 2010).

Las membranas requieren de cierta fluidez que permita el movimiento tanto transversal como lateral no sólo de los lípidos sino también de proteínas transportadoras, sustratos y productos de las enzimas asociadas tanto a las membranas como al transporte de electrones. Las cadenas hidrófobas de los ácidos grasos tendrán propiedades de gel o de líquido, dependiendo de la temperatura; si la temperatura son bajas dichos ácidos estarán en forma de gel, mientras que si aumenta su temperatura se producirá su transición a fase líquida. La temperatura a la que se produce el cambio de fase de gel a líquido recibe el nombre de temperatura de cambio de fase, por lo cual es necesario que las membranas se encuentren a una temperatura superior a la temperatura de cambio de fase. Las plantas no regulan su temperatura, por lo que el aumento de la insaturación de los ácidos grasos de la membrana catalizado por las **desaturasas** les permitirá mantener la fluidez de las membranas a temperatura ambiente relativamente bajas (Revilla y Zarra, 2000).

#### **2.2.2.2 Lípidos**

Los lípidos en las plantas representan un grupo muy grande de componentes con diversas funciones en la fisiología y metabolismo de los productos cosechados. La mayoría de dichos productos, tienen relativamente bajas concentraciones de lípidos, a excepción del aguacate y algunas semillas oleaginosas. La mayor parte de los lípidos de las plantas están en forma de compuesto de almacenamiento, así como también funcionan como componentes en las membranas celulares.

Bioquímicamente, los lípidos se agrupan en lípidos neutros, ceras, fosfolípidos, glicolípidos y terpenoides. Los lípidos neutros comprenden las grasas y los aceites y representan principalmente los compuestos de almacenamiento del carbono. Las ceras están compuestas por cadenas grandes de ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y cadenas grandes de alcoholes. Estos componentes forman la delgada capa de cera sobre la superficie de las hojas, frutas y otras partes de las plantas. Los fosfolípidos y glicolípidos son componentes de las membranas

celulares y los terpenoides son compuestos acíclicos insolubles en agua y cíclicos como esteroides, esencialmente aceites y caucho (Kays y Paull, 2004).

### 2.2.2.3 Biosíntesis de los ácidos grasos

Las propiedades físicas y químicas de los lípidos depende de la longitud de las cadenas de los ácidos grasos presentes, los cuales se pueden dividir en saturados e insaturados en diferentes grados. Los ácidos grasos más comunes en las plantas se encuentran en un rango de 4 a 26 carbonos, siendo el ácido oleico (18:0) y linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$ ) los más encontrados en la naturaleza. Los lípidos de las plantas son principalmente glicerolípidos, donde dos de los tres grupos hidroxilo del glicerol están ocupados por ácidos grasos, siendo los ácidos 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3 los que componen el 90% de la casi todas las membranas de las plantas (Kays y Paull, 2004).

La formación de ácidos grasos es el primer paso en la biosíntesis de los glicerolípidos (Figura 8), cuyo sitio de síntesis se encuentra en los plástidos y la cual se inicia por los depósitos de Acetil-Coenzima A (SHCoA), que puede ser transformada a malonil-CoA por la unión del CO<sub>2</sub> a la ACoA, mediante la acción de la enzima Acetil-CoA-Carboxilasa (ACCase) (1) o a la proteína acarreadora de los grupos acilo (ACP) por acción de la Acetil-CoA-ACP transacilasa (2) y formar el grupo Acetil-ACP. La nueva malonil-CoA forma el complejo Malonil-ACP, mediante la malonil-CoA:ACP transacilasa (3), que a su vez puede unirse a otra molécula de Acetil-CoA o a un grupo de Acil-ACP para formar  $\beta$ -Cetoacil-ACP sintetasa III (KAS III) (4), la cual ocupa grupos hasta de 4 carbonos, para continuar posteriormente con la extensión de cadenas por la acción de  $\beta$ -Cetoacil-ACP sintetasa I (KAS I) (5), la cual puede utilizar cadenas de 14 carbonos (C<sub>14</sub>-ACP) para formar el palmitoil-ACP, y finalmente la  $\beta$ -Cetoacil-ACP sintetasa II, condensa el palmitoil-ACP con el malonil-ACP para formar el estearil-ACP. Todas las cadenas formadas son posteriormente reducidas, deshidratadas y reducidas nuevamente para formar el acil-ACP que corresponde a la acción de  $\beta$ -Cetoacil-ACP reductasa (6),  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa (7) y enoil-ACP reductasa (8),

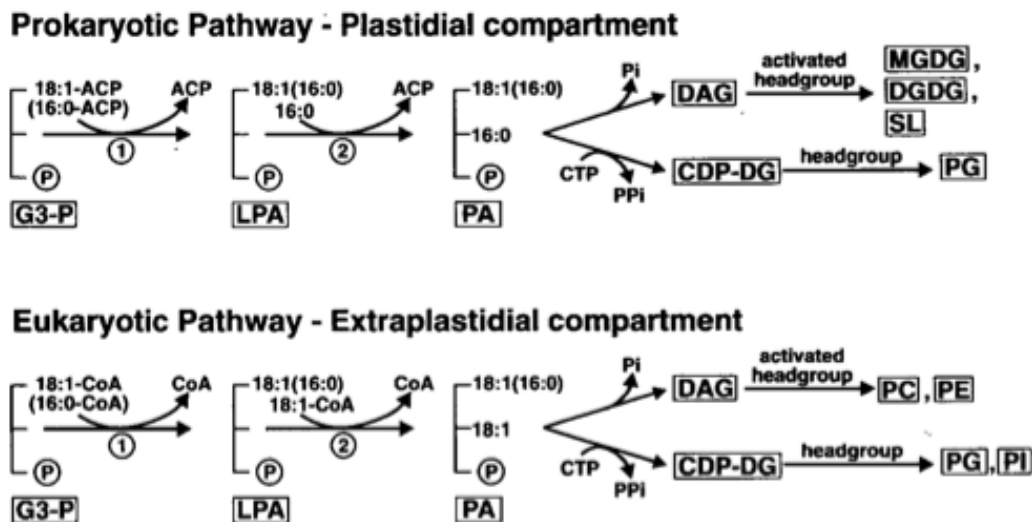
de tal forma que cada ciclo de síntesis se inicia con la unión del nuevo residuo de ácido graso-ACP a un grupo malonil-ACP por medio de un enlace tioéster, para formar en su mayoría productos como 16:0-ACP o 18:0-ACP (Ohlrogge y Browse, 1995).



**Figura 8.** Principales reacciones de síntesis de ácidos grasos (Ohlrogge y Browse, 1995).

En la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados, el primer paso, se lleva a cabo por la acción de la enzima estearil-ACP desaturasa en el mismo plástido para convertir el grupo 18:0-ACP a 18:1-ACP (oleoil-ACP), mientras que el 16:0-ACP no es desaturado por esta enzima, por lo cual los principales productos de síntesis de ácidos grasos en plástidos son 16:0-ACP y 18:1-ACP. Por otro lado, existen otras desaturaciones que son catalizadas por acil-desaturasas específicas de los ácidos grasos esterificados (Ohlrogge y Browse, 1995).

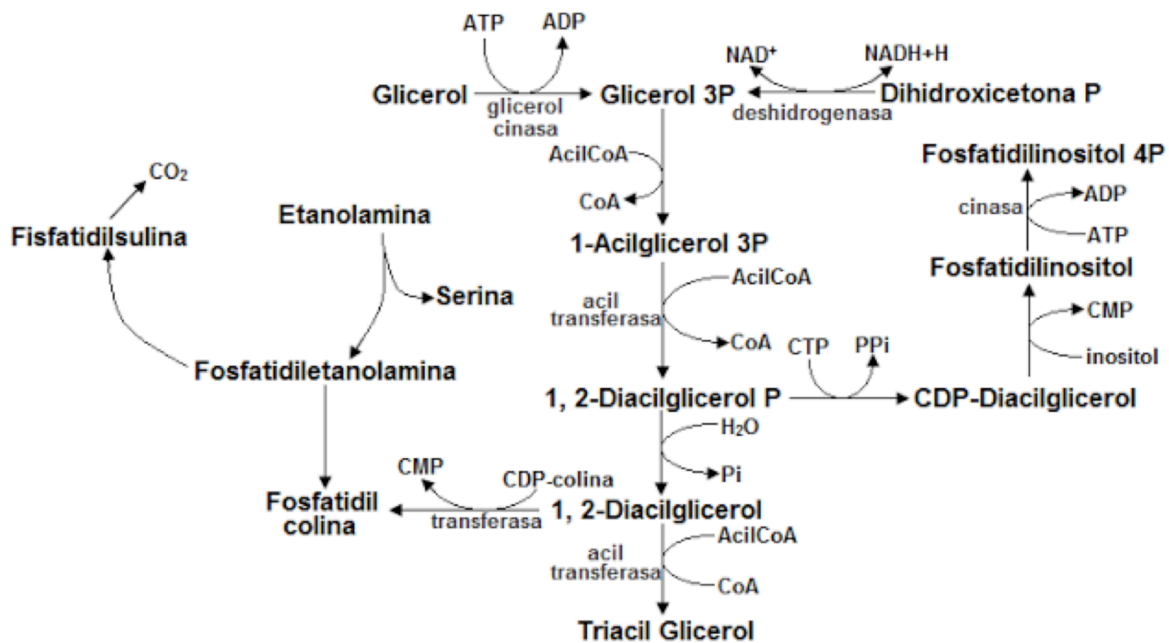
Dentro de la síntesis de glicerolípidos, los ácidos grasos 16:0 y 18:1, pueden tener dos caminos diferentes, el primero, incorporarse a las rutas metabólicas dentro del mismo plástido y el segundo ser utilizados en las vías metabólicas externas, llamadas ruta “procariota” y “eucariota” respectivamente. En la vía “eucariota”, los ácidos grasos que fueron liberados por la acción de la PAGA-tioesterasa del estroma son nuevamente esterificados a la CoA (grupos acil-CoA), pasan al citosol y pueden estar disponibles para las actividades aciltransferasas. Los lípidos que se encuentran en esta vía son grupos de C:16 y C:18 en la posición sn-1 y sólo el C:18 en la sn-2. Con respecto a la ruta “procariota”, las cadenas de grupos acil-PAGA se utilizan inmediatamente por las enzimas aciltransferasas dentro de los cloroplastos. La característica de los ácidos grasos de los glicerolípidos de ésta ruta, es que el glicerol está ocupado por cadenas C:18 en la posición sn-1 y en el grupo C:16 en la posición sn-2 (Figura 9) (Harwood, 1997).



**Figura 9.** Ruta procariótica y eucariótica en la biosíntesis de glicerolípidos.

La esterificación de la molécula de glicerol-3-fosfato por los ácidos grasos, se realiza por la acción de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (GFAT) y 1-acilglicerol-3-fosfatoaciltransferasa (AGFAT). El ácido fosfatídico (AF) que es producido es el precursor común de los glicerolípidos y por acción de la fosfatasa puede formar el

Diacilglicerol (DAG) o formar parte de un nucleótido activado de DAG (CDP-DAG) mediante la reacción entre el AF con el 5'-trifosfato citidina (TFC). En caso de sustrato activo el DAG, se formaría la citidina 5'-difosfato de colina, etanolamina y metiletanolamina para posteriormente formar fosfolípidos; mientras que si el complejo CDP-DAG es el que esta activo, se une con el mioinositol, serina y glicerol-3-fosfato para formar el fosfatidilinositol (FI), fosfatidilserina (FS) y fosfatidilglicerofosfato, el cual es precursor del fosfatidilglicerol (FG). Por otro lado, el UDP-galactosa y UDP-sulfoquinovosa son sustratos para la síntesis de monogalactosildiácilglicerol (MGDG) y sulfoquinovosildiácilglicerol (SQDG), el digalactosildiácilglicerol (DGDG) es sintetizado a partir del MGDG (Figura 10) (Ohlrogge y Browse, 1995). Las insaturaciones de los glicerolípidos, se producen por la acción de las enzimas desaturasas unidas a las membranas del cloroplasto y del retículo endoplasmático (Somerville y Browse, 1991; Gibson *et al.*, 1994).



**Figura 10.** Síntesis de triglicéridos.

Los lípidos en la membrana se caracterizan por definir a cada una de las especies vegetales; sin embargo, varían dentro de cada célula lo cual dificulta el conocimiento de su intervención exacta en los procesos fisiológicos y en el



desarrollo de los tejidos. Las membranas de cloroplastos y cromoplastos están compuestas principalmente de glucosilgliceridos; monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG) y sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG), y el único fosfolípido es el fosfatidilglicerol (FG). En otras membranas extracloroplastídicas el fosfolípido mayoritario es la fosfatidilcolina (FC), seguido por el fosfatidilinositol (FI), fosfatidilserina (FS) y en la membrana interna de la mitocondria el difosfatidilglicerol (DFG) o cardiolipina (Ohlrogge y Browse, 1995). Benito-Bautista (2002), reporta que el fosfolípido mayoritario en los frutos de guayaba es la fosfatidilcolina con el 33.7%, seguido por el fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico con un 11.5% respectivamente.

#### **2.2.2.4 Cambios en las membranas celulares durante el almacenamiento**

Los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares durante la maduración y senescencia de los frutos se manifiestan en una degradación en su estructura y función, evidenciado por la fuga y pérdida intracelular de sus componentes con un reflejo en el incremento en su permeabilidad y fluidez. Este daño es atribuido principalmente a un acelerado metabolismo de los lípidos de la membrana y cambios en la organización molecular de la bicapa (Thompson *et al.*, 1998). Maalekuu *et al.* (2005), al evaluar la fuga de electrolitos en genotipos de pimiento, observaron que a mayor pérdida de agua existía una mayor fuga de electrolitos, por lo que establecieron una relación positiva entre la pérdida de peso y la fuga de electrolitos, lo cual lo asociaron con las características estructurales y funcionales de las membranas. En melón, el ablandamiento y la senescencia no han sido asociados con la degradación de la pared celular, sino con la pérdida de la integridad de la membrana del mesocarpo hipodérmico (Lester, 1988). La pérdida de la integridad de la membrana del tejido del mesocarpo hipodérmico ha sido atribuida a la actividad de la lipoxigenasa, lo cual resulta en la perturbación de las membranas microsomales (Lester, 1990). Por lo tanto, el ablandamiento y la senescencia podrían también estar regulados por la integridad de la membrana celular. Una

pérdida de la integridad de la membrana fue observada durante la maduración de frutas de melón y manzana (Lester y Stein, 1993; Lurie y Ben-Arie, 1983), y durante la senescencia de pimiento (Lurie y Ben-Yehoshua, 1986). Éstos autores reportan una correlación entre los cambios de la composición de los lípidos, particularmente en la relación de esteroides:fosfolípidos y la permeabilidad de la membrana. En manzana, los cambios en la integridad de las membranas microsomales se correlacionan con un incremento en las concentraciones de esteroides libres y un incremento en los índices de saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Lurie y Ben-Arie, 1983). Un comportamiento similar fue reportado en melón, en donde el contenido de esteroides libres incrementa durante el proceso de maduración, mientras que el contenido de fosfolípidos disminuye, y esto se correlacionó con la pérdida en la integridad de la membrana (Lacan y Baccou, 1996). La composición de esteroides libres y su interacción con fosfolípidos adyacentes puede restringir el movimiento de las cadenas acilo, resultando en un decremento en la fluidez de la membrana y un incremento en la fuga de electrolitos (Douglas y Walker, 1984). Éste comportamiento fue encontrado en plátano durante su maduración y se correlacionó con los cambios en la composición de los lípidos (Wade *et al.*, 1980).

También se han reportado cambios en las proteínas de membrana durante el proceso de senescencia de manzana (*Malus domestica* Borkh cv. Golden Delicious), ya que se observa una reducción del 30% de las proteínas en frutos senescentes (25 µg/gpf), mientras que en frutos no senescente el contenido de proteína fue mayor (37.5 µg/gpf); también señalaron que la fosforilación promovida por Ca y la calmodulina era mayor durante los primeros estados de senescencia, mientras que hubo una notable disminución en la fosforilación promovida por esos factores en los tejidos senescentes (Paliyath y Poovaiah, 1985). Estos datos nos sugieren que existen alteraciones en las funciones de las membranas durante el proceso de maduración y senescencia de los frutos de los cuales no sabemos su efecto sobre las características de textura de esos frutos. Njoroge *et al.* (1998) evaluaron el efecto de CaCl<sub>2</sub> en tomates sobre la integridad de las membranas, observando que los tomates tratados con calcio presentaron una menor fuga de proteínas de membrana (0.34 g/Kgpf) respecto a los frutos control (1.13 g/Kgpf).

Por otro lado, uno de los mecanismos que se han visto involucrados en la pérdida de firmeza de los frutos es el estrés oxidativo, ya que el proceso de ablandamiento es un fenómeno de oxidaciones secuenciales que necesitan de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, las cuales dañan la membrana plasmática y proteínas (Jiménez *et al.*, 2002).

La producción de ROS ocurre principalmente como producto del metabolismo celular en la mitocondria y la respiración mitocondrial. La producción excesiva de ROS, durante la respiración, puede dañar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y en consecuencia afectar la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática (Mittler, 2002). Por lo tanto, es necesario que exista un balance entre la producción de ROS y la eliminación de éstas por medios enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), y por antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, ácido ascórbico y compuestos fenólicos. A este respecto, Razzaq *et al.* (2013), observaron durante el proceso de maduración en frutos de mango 'Samar Bahist Chaunsa', que incrementa la actividad de endo-PG, exo-PG y EGasa; enzimas asociadas al ablandamiento. Así mismo, se presentó un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, POD y en la capacidad antioxidante. Estos autores sugieren que existe una estrecha relación entre la actividad de las enzimas responsables del ablandamiento y la actividad enzimática de los frutos. Por otro lado, Castillo-Godina *et al.* (2016), reportaron que la aplicación en la solución nutritiva de 5 mg L<sup>-1</sup> de selenito de sodio sobre tomate, presentó una mayor actividad de las enzimas antioxidantes como catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y superóxido dismutasa (SOD), enzimas que interviene en la eliminación de ROS. Mientras que Djanaguiraman *et al.*, (2005), observaron que la aplicación foliar de 50 mg L<sup>-1</sup> de selenato de sodio en soya, disminuye el contenido de MDA y presenta un menor daño en las membranas celulares, aunado a esto se observó un incremento en las enzimas antioxidantes como CAT, SOD y GSH-Px. Estos autores concluyen que el incremento en las enzimas antioxidantes disminuye el daño peroxidativo en las membranas. Esto podría indicar que el selenio podría

ayudar a mantener la integridad de las membranas celulares y así mantener una mejor firmeza en los frutos de guayaba.

Por otro lado, Yu *et al.* (2003), reportaron que la aplicación de 0.25 mM de ácido cafeico sobre la raíz de pepino, presentó una menor peroxidación en los lípidos reflejada en una menor cantidad de malondialdehído (MDA), y una mayor actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), enzima que interviene en la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Mientras que Baziramakenga *et al.* 1995, observaron en raíz de soya al exponerse a 100  $\mu$ M de ácido benzoico y cinámico, que el contenido de MDA es mayor en comparación con las muestras control, siendo el ácido cinámico el que presentó una mayor concentración. Estos estudios nos demuestran que dependiendo de la estructura de los compuestos fenólicos es el efecto que podría tener sobre las reacciones peroxidativas de las membranas.

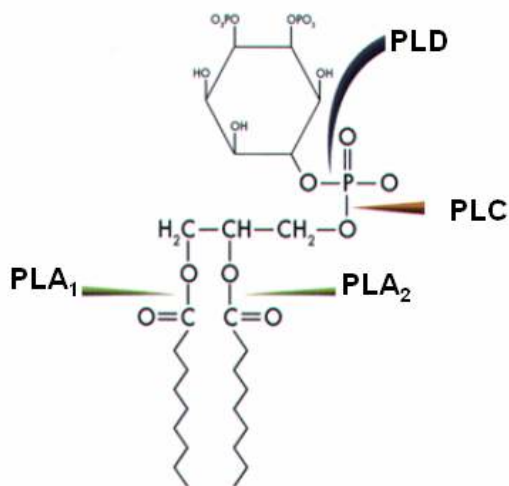
Otros compuestos fenólicos de interés son los flavonoides, ya que además de su actividad antioxidante, también pueden participar en la inhibición de enzimas oxidasas como lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa. Aunado a esto, se ha observado que también inhiben enzimas que participan indirectamente en los procesos oxidativos como la fosfolipasa A<sub>2</sub>, y al mismo tiempo estimulan la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Groot *et al.*, 1998; Sudheesh *et al.*, 1999). Otra función importante de los flavonoides es su interacción con la bicapa lipídica de la membrana plasmática en la interfase líquido-agua o en el corazón hidrofóbico de la membrana, mayormente asociado con la formación de enlaces de hidrógeno (Oteiza *et al.*, 2005). Abram *et al.* (2013), demostraron la interacción de catequina, epicatequina, epigallocatequina y epigallocatequina-3-galato sobre la superficie de membranas mediante enlaces de hidrógeno, en liposomas compuestas de fosfatidilcolina y esfingomielina, siendo la epigallocatequina-3-galato la que tuvo la mayor interacción, lo cual podría ayudar a mejorar el ordenamiento de los lípidos y prevenir la oxidación lipídica y así proteger las membranas celulares. Un comportamiento similar fue observado por Verstraeten *et al.* (2003), en liposomas compuestas por fosfatidilcolina y fosfatidilserina (60:40 relación molar), donde la epicatequina, catequina y procianidina inhibieron la peroxidación lipídica y fue

correlacionado principalmente con el potencial de superficie de membrana y su integridad, debido a la interacción que tienen estos flavonoides con la superficie de la membrana.

De acuerdo a lo anterior, se observa el efecto positivo que tienen los compuestos fenólicos en la estabilidad e integridad de las membranas, sin embargo, no existen estudios sobre que efecto podrían tener estos compuestos que forman parte de los frutos sobre las membranas celulares de los mismos.

### 2.2.2.5 Enzimas de degradación de los lípidos de membrana

La vía de degradación de los fosfolípidos durante la senescencia de las plantas involucra la acción secuencial de enzimas tales como fosfatidilcolina-fosfatohidrolasa o fosfolipasa D, fosfato-fosfatidasa o fosfolipasa C, lípido-acilhidrolasa o fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, y lipoxigenasa, las cuales se clasifican de acuerdo a su sitio de hidrólisis (Figura 11) (Paliyath *et al.*, 2008).



**Figura 11.** Enzima fosfolipasa A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) , hidroliza el primer acilo entre el enlace éster y el glicerol; fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), hidroliza el segundo acilo entre el enlace éster y el glicerol; fosfolipasa C (PLC), hidroliza el enlace éster entre el glicerol y el grupo fosfato; fosfolipasa D (PLD), hidroliza el enlace éster entre el fosfato y el grupo variable.

#### **2.2.2.5.1 Fosfolipasa D**

La enzima fosfolipasa D (FLD) se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal, en forma soluble o asociada a la membrana. Su actividad produce un aminoalcohol y ácido fosfatídico, pero en algunos casos cataliza la reacción de transfosfatidilación, donde el agua es reemplazada por alcoholes primarios. Dicha enzima juega un papel importante en los procesos celulares que implican cambios en las membranas celulares como la senescencia, daños por estrés, movilización de lípidos durante la germinación de semillas y respuestas celulares a estímulos hormonales y del medio ambiente, así como también en la acción y producción de hormonas de respuesta a estrés como el ácido abscísico, ácido jásmonico y etileno (Wang, 2001). Sin embargo, su principal función es el catabolismo y recambio en la composición de los lípidos de membrana. El ácido fosfatídico, el cual es el producto de degradación de esta enzima, es utilizado como intermediario en la síntesis de varios glicerolípidos (Thompson *et al.*, 1998).

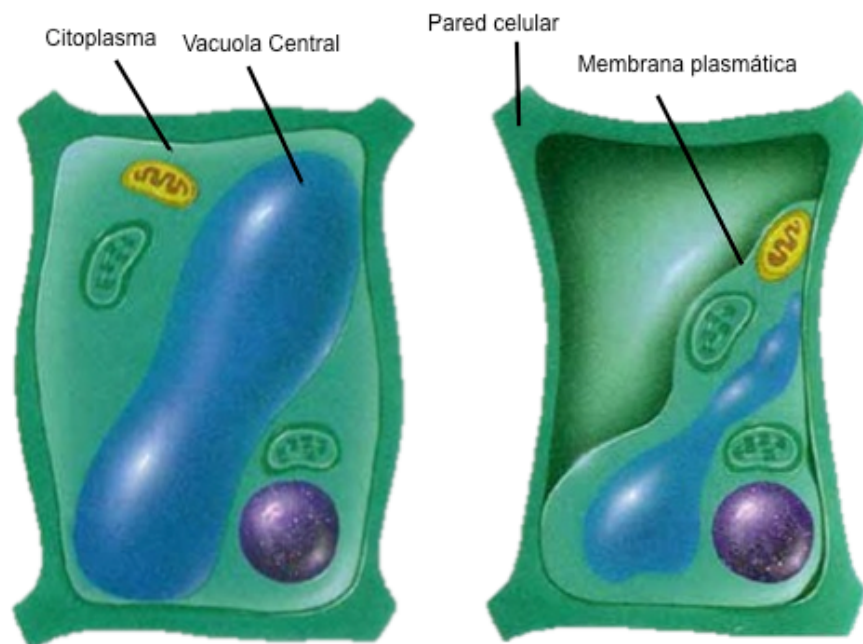
#### **2.2.2.5.2 Lipoxigenasa**

La lipoxigenasa juega un importante rol durante la germinación de semillas (Kato *et al.*, 1992), maduración de frutas (Ferrie *et al.*, 1994) y en la senescencia de plantas (Arora *et al.*, 2002), la cual induce el deterioro de la membrana por la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados libres formando hidroperóxidos, estos pueden degradarse y formar radicales libres, etano y sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (Sanz *et al.*, 1992). Se ha reportado que la actividad de LOX incrementa durante la maduración de frutos de guayaba y a su vez se observa un incremento en el contenido de MDA resultando de un daño celular y estrés oxidativo de las membranas celulares (Mondal *et al.*, 2009).

#### **2.2.3 Presión de turgor**

El incremento del contenido de agua en la célula es uno de los factores que está involucrado en el crecimiento celular, debido al incremento en la presión de

turgor que provoca que las paredes se extiendan irreversiblemente y el volumen aumente. En este proceso el agua es uno de los factores más importantes. En la célula madura, la vacuola es el compartimento intracelular de mayor volumen, éste ocupa aproximadamente el 90% del volumen celular (Figura 12) (Hsiao y Liu-Kang, 2000). Al mismo tiempo, la presión de turgor regula la expansión celular, que se manifiesta como un incremento en el volumen que tiene lugar en la vacuola (Cosgrove, 1993).



**Figura 12.** Presión de turgor generada por la vacuola (Hsiao y Liu-Kang, 2000).

Una de las características más importantes de la pared celular es su extensibilidad como consecuencia de la síntesis de nuevos compuestos químicos y la deformación mecánica causada por la presión de turgor interna de la célula, lo que provoca cambio en las fuerzas físicas al interior de la pared y las fuerzas externas que la afectan; así la síntesis de compuestos favorecen el crecimiento transversal (engrosamiento), mientras que el turgor propicia la expansión del área celular (Von *et al.*, 2001). Existen diversos factores que son responsables de la presión de turgor; entre ellos, la concentración de solutos entre la vacuola y el medio extracelular, la semipermeabilidad de las membranas y la rigidez de la

pared (Palta, 1990). Dicha presión de turgor es un componente importante que contribuye en la textura y pérdida de firmeza de los frutos, y ha sido relacionada con la pérdida de agua por transpiración, y esta presión decrece durante la maduración de los frutos. Como lo observado en tomate, en donde la presión de turgor y la pérdida de agua disminuyeron, al mismo tiempo que se fue perdiendo firmeza durante las diferentes etapas de maduración. En este sentido, los datos de presión de turgor y firmeza nos indican que el ablandamiento de las frutas intactas es provocado por un decremento en el turgor celular, el cual coincide con los cambios en la pared celular como resultado de la relajación de la misma. Así como también, un componente importante es la transpiración, la cual ocurre en paralelo con la degradación de la pared celular y la reducción en la adhesión intracelular (Saladié *et al.*, 2007).

### **2.3 Participación del calcio en el metabolismo del fruto**

La participación del calcio en las propiedades de textura de las frutas en forma general se asocia como un elemento que ayuda a mantener la firmeza de los frutos debido a que incrementa la fuerza de los enlaces con los componentes de la pared celular, formando pectato cálcico al unirse con los grupos carboxilo de las pectinas. Así mismo se ha indicado que la degradación de dichos pectatos se produce por la acción de la enzima poligalacturonasa contribuyendo a la pérdida de firmeza, y que la acción de esta enzima, es inhibida por altas concentraciones de calcio, contribuyendo así a la retención de firmeza (Monge *et al.*, 1994).

No obstante, el calcio ejerce otras funciones que pueden tener implicaciones en la textura de los frutos. Una de estas funciones es que puede servir como segundo mensajero de la célula participando en un gran número de vías de transducción y puede además transmitir la especificidad de un estímulo recibido de diferentes formas, tales como (Sanders *et al.*, 2002):

1. La señal del calcio puede por sí sola ser la causante de la respuesta, pero con la participación paralela de otros elementos.
2. La especificidad puede estar definida en las propiedades espaciales de la señal del calcio, ya sea porque esta localiza en algún compartimento



específico, o porque la fuente de la señal del calcio puede desencadenar selectivamente los elementos de respuesta.

3. Las propiedades dinámicas de la señal del calcio (oscilaciones) pueden determinar la eficacia con la que la respuesta se induce.
4. Los elementos que participan en la respuesta fisiológica deben de estar presentes en el tipo particular de la célula en la cual la señal del calcio se origina.

Además a nivel de la planta se requiere de un suministro constante de calcio para mantener un crecimiento y desarrollo normales. El calcio obtenido a partir de la raíz origina concentraciones milimolares en los tejidos vegetales y en la mayoría de las plantas el calcio es el segundo metal y el quinto elemento más importante después del C, H, O y K. A nivel subcelular, en ciertos organelos como la vacuola las concentraciones de calcio son muy elevadas, las cuales se encuentran en forma de sales de oxalato, fosfato o fitato y dicho organelo parece ser importante para reponer el calcio de la célula, ya que ocupa del 90-95% del volumen de ésta. En cuanto al nivel del calcio citoplasmático de una célula vegetal en reposo es de 3 a 4 veces de magnitud menor (100-200 nM). Éstas concentraciones de calcio se mantiene por la actividad de bombas, transportadores y canales de calcio localizados en la membrana plasmática y en las membranas de los organelos celulares (Gilroy *et al.*, 1991). El calcio entra a la planta a través de canales iónicos que son permeables al calcio en la membrana plasmática, y dado que la concentración del mismo en el citoplasma es citotóxica, el nivel nanomolar de el mismo en las células en reposo se mantiene por las enzimas  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasas y los antiportadores  $\text{H}^+/\text{Ca}^+$ ; la actividad de éstas remueven el calcio citoplásmico ya sea al apoplasto (espacio extracelular) o al lumen de los organelos intracelulares (vacuola o retículo endoplásmico) (White y Broadley, 2003). Hirschi (2001), sugiere que las  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasas, las cuales tienen alta afinidad pero baja capacidad para transportar calcio, son responsables de aumentar la homeóstasis de calcio citoplásmico en la célula en reposo; mientras que los antiportadores  $\text{H}^+/\text{Ca}^+$ , los cuales tienen afinidades menores por el calcio pero tienen alta capacidad para transportarlo, podrían remover el calcio del citosol durante el periodo de

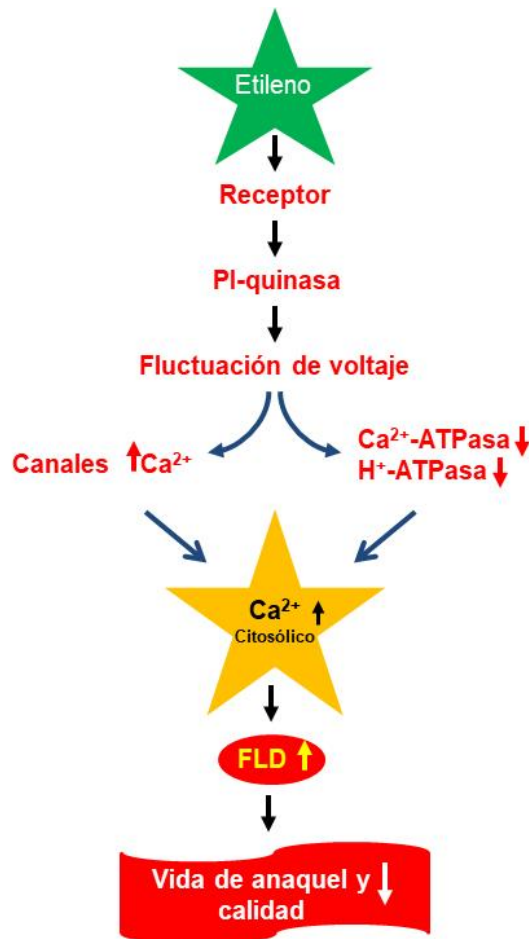
señalización del calcio, y así, modular las concentraciones de calcio citoplásmico. Cuando se incrementa el calcio extracelular directamente estimula el cierre del estoma o reduce que éste se abra por efecto de la luz, contenido de potasio o bajas concentraciones de CO<sub>2</sub>. También, cuando el calcio o trifosfato de inositol es liberado del citoplasma, puede iniciar el cierre del estoma. Este comportamiento incrementa el contenido de calcio extracelular, sin embargo el estoma únicamente se cierra cuando el contenido de calcio está aproximadamente arriba de 500 nM a 600 nM (Gilroy *et al.*, 1990).

La entrada rápida de calcio por medio de los canales catiónicos en la membrana plasmática, tonoplasto y/o retículo endoplásmico genera perturbaciones en los niveles de calcio citoplásmico que inician una respuesta celular a varias señales de desarrollo o del medio ambiente. Existen proteínas que cambian de conformación o actividad catalítica al unirse al calcio, como la calmodulina, calcineurina y cinasas que son dependientes del calcio (CDPKs), las cuales permiten la percepción y transducción de señales que son desencadenadas por niveles elevados de calcio citoplásmico; éstas enzimas son llamadas “sensores de calcio citoplásmico” (White y Broadley, 2003). Cuando las concentraciones extracelulares de calcio incrementan, provocan un incremento en la concentración de calcio citoplásmico y se induce la formación del complejo calcio-calmodulina (Ca<sup>+2</sup>/CaM), el cual es responsable de regular diferentes enzimas como la NAD quinasa, calcio ATPasa, adenilato ciclasa. H<sup>+</sup> ATPasa y protein cinasa, NAD óxido reductasa, NAD cinasa y CaATPasa (Ferguson, 1984).

Por otro lado, se ha reportado que el calcio retrasa el proceso de maduración y senescencia debido a que existe un decremento en la tasa de respiración y producción de etileno, y en los cambios de coloración, en la disminución de la pérdida de fosfolípidos de la membrana y la disminución en el ablandamiento (Hirschi, 2004), como lo observaron Picchioni *et al.* (1998), donde frutos de manzana Golden Delicious infiltrada con soluciones de calcio y almacenada en refrigeración (0 °C más 7 días a 20 °C), mantuvo 10 veces más firmeza en comparación con el control, así mismo la concentración de fosfolípidos totales y especialmente la fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esteril glucósidos acilados en la membrana incrementaron en éstos frutos y disminuyeron en los frutos

control. Dicho efecto se atribuye a que el calcio es un protector de la membrana celular y por tanto mantiene la integridad de ésta.

No obstante, se ha descrito que mantener bajas concentraciones de calcio citoplásmico no necesariamente excluye la posibilidad de requerir altas concentraciones de calcio extracelular para generar ciertos estímulos de respuesta anti senescencia. En otras palabras, la actividad de ciertos sistemas enzimáticos mediados por el calcio, puede ser activada por una alta concentración de calcio, y esta actividad puede ser importante en el retraso de la senescencia; sin embargo, un incremento en la concentración externa de calcio no necesariamente indica un incremento en la concentración interna. Así como también a nivel celular, un incremento en la concentración de calcio citoplásmico como respuesta a una señal externa es un evento primario que conlleva a la activación de CaM, proteínas cinasas y otras enzimas; así mismo los cambios en la composición de las membranas involucran la fosforilación de fosfatidilinositol resultando en la formación de fosfatidilinositol-4-fosfato y de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato que proporcionan un medio paralelo y sinérgico que amplifica las señales externas. El ácido fosfatídico, formado por la acción de la fosfolipasa D ha sido ampliamente reconocido por un componente clave en la vía de la trasducción de señales. La fosfolipasa D es una enzima clave que integra la acción receptora del etileno, el incremento en el calcio citoplásmico y la generación de ácido fosfatídico, por lo tanto, la regulación de la actividad de esta enzima es un evento crucial en el funcionamiento celular (Figura 13) (Ferguson, 1984; Mocrief *et al.*, 1990).



**Figura 13.** Señalización de la fosfolipasa D y su relación con el etileno en la degradación de la membrana y pérdida de calidad y vida de anaquel (Aghdam *et al.*, 2012).

## 2.4 Participación del selenio en el metabolismo del fruto

Actualmente el selenio se considera un elemento traza esencial para plantas y animales, pero puede llegar a ser tóxico en altas concentraciones. En humanos, el selenio es un elemento importante en 25 selenoproteínas incluyendo glutatión peroxidasa, iodotironina deiodinasas y tioredoxina reductasas, las cuales están involucradas en muchos mecanismos de regulación y protección redox (Rayman, 2012). En plantas el selenio es metabolizado por la vía del azufre, su distribución, y acumulación dependerá de la especie química y la concentración del elemento suministrado a las raíces o por vía foliar, así como de la naturaleza y la concentración de otras sustancias en la solución (Terry *et al.*, 2000). El selenio se

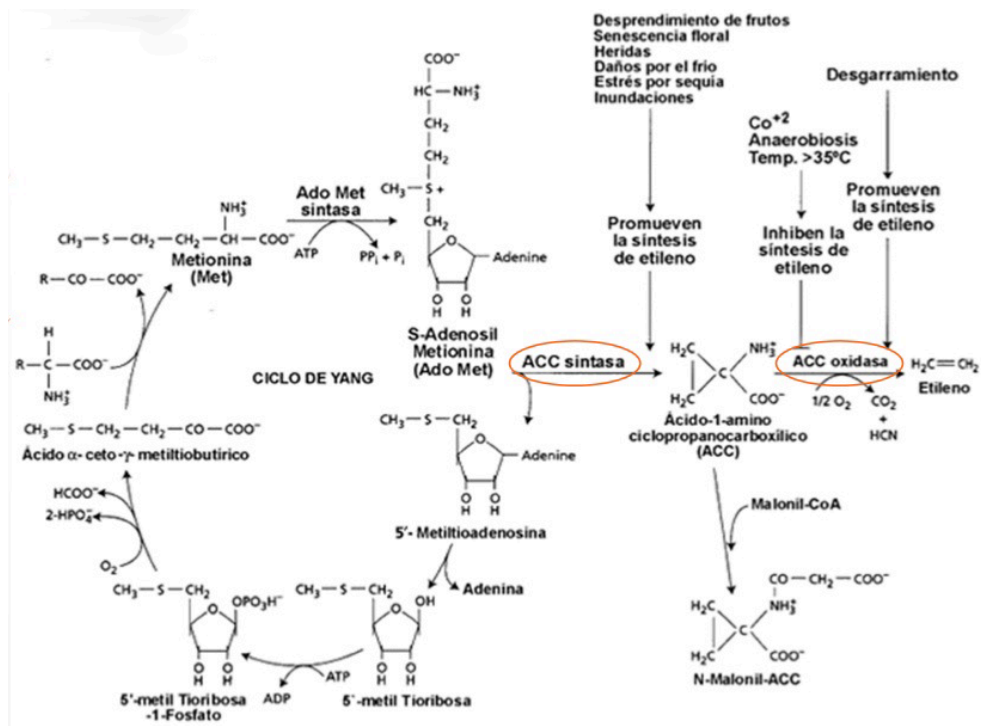
encuentra en la naturaleza y sistemas biológicos como selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ) y seleniuro ( $\text{Se}^{2-}$ ) (Broadley et al., 2006). Debido a sus diferencias bioquímicas entre ellas, se pueden presentar modificaciones isoméricas al interactuar con la flora microbiana y causar la oxidación o reducción, así como la formación de compuestos orgánicos (Valdiviezo, 2012).

Las aplicaciones de selenio vía foliar o en el suelo más utilizadas son el selenato y el selenito sódico debido a que las plantas lo absorben con mayor facilidad que otras formas de Se como las orgánicas (Selenocisteína y selenometionina) (Terry et al., 2000). El selenato al ser muy similar al sulfato, no sólo es absorbido vía los transportadores del sulfato, sino también es incorporado en los aminoácidos de cisteína y metionina. El selenato absorbido por las plantas es traslocado a los brotes, y en los cloroplastos se reduce a selenito por reacciones catalizadas por las enzimas ATP sulforilasa y adenosin fosfosulfato reductasa (Van Hoewyk, 2013). Esta reducción parece estar limitada por la asimilación de los iones selenato. El selenito formado es convertido en selenido y posteriormente en aminoácidos como selenocisteína (catalizada por la enzima cisteína sintasa) y selenometionina. La selenocisteína puede ser incorporada en proteínas, y ya que no tiene la forma normal de plegamiento de la cisteína, su acción como enzima podría verse afectada (Van Hoewyk, 2013). Sin embargo, no se ha encontrado evidencia directa del mal plegamiento de las selenoproteínas.

Por otro lado, las ROS tienen en las plantas papeles importantes en el crecimiento, desarrollo e interacciones con el medio ambiente, y por tanto, se producen en cantidades significativas durante la fotosíntesis y la respiración. Sin embargo, se mantiene la homeóstasis redox mediante mecanismos que controlan la síntesis y depuración. El desbalance entre la producción y la eliminación de las ROS en los organismos conducen a lo que se conoce como estrés oxidativo (Mittler, 2002). El selenio disminuye el estrés oxidativo debido a sus propiedades antioxidantes que ayudan a controlar y disminuir las ROS mediante la activación de diferentes enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peróxidasa (GSH-Px), ya que puede servir como cofactor de dichas enzimas (Combs, 2001; Stadtman, 1990; Roman et al., 2014). Feng et al. (2013), propone que la acción del selenio sobre las ROS ayudan a mantener la estructura

y función celular bajo diferentes condiciones de estrés. Esto podría estar asociado a una disminución en el daño peroxidativo sobre las membranas celulares y así poder mantener su integridad y la firmeza en frutos tratados con selenio. Esto ha sido comprobado por Castillo-Godina *et al.* (2016), ya que reportaron que la aplicación en solución nutritiva de 5 mg L<sup>-1</sup> de selenito de sodio sobre tomate, presentó una mayor actividad de CAT, GSH-Px y SOD, y mantuvo una mejor firmeza de los frutos. Además, se ha reportado en lechuga senescente y soya, que el selenio mejora la capacidad antioxidante de dichos productos, ayudando a inducir el crecimiento en lechuga (Xue *et al.*, 2001) y retrasando la senescencia por la disminución de ROS en soya (Djanaguiraman *et al.*, 2005). Aunado a esto, se ha reportado que las bajas concentraciones de selenio disminuyen los efectos de deterioro de diversos tipos de estrés ambiental incluyendo frío (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2010), alta temperatura (Djanaguiraman *et al.*, 2010), sequía (Hasanuzzaman y Fujita, 2011), radiación UV-B (Yao *et al.*, 2010), desecación (Pukacka *et al.*, 2011), agua (Wang, 2011), sal (Hasanuzzaman *et al.*, 2011), metales pesados (Kumar *et al.*, 2012) y senescencia (Djanaguiraman *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2001); además de estimular el crecimiento de las plantas (Hartikainen *et al.*, 2000). Sin embargo, en plantas los mecanismos bajo los cuales el selenio mejora la resistencia a este tipo de estrés no son bien conocidos.

Estudios genéticos y moleculares realizados durante el proceso de desarrollo y maduración han permitido un gran avance en el conocimiento del mecanismo de síntesis, regulación y acción del etileno (Maunder *et al.*, 1987; Seymour *et al.*, 1993). La síntesis de etileno inicia con el aminoácido metionina a través de una serie de reacciones en las que participa la enzima metionina adenosil sintasa (AdoMet sintasa), 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC sintasa) y 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACC oxidasa), y con la presencia de intermediarios como la adenocín metionina (AdoMet) y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Figura 14) (Yang y Hoffman, 1984).



**Figura 14.** Síntesis de etileno (Yang y Hoffman, 1984).

Se ha reportado que el selenio también retrasa la senescencia por la disminución en la producción de etileno, retrasando la maduración y ablandamiento, incrementando la vida de anaquel y mejorando la calidad en diferentes frutos como tomate (Pezzarossa *et al.*, 2014), durazno y pera (Pezzarossa *et al.*, 2012) y plátano (Nitin y Vinot, 1990).

Zhu *et al.* (2017), han reportado que la aplicación foliar de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en tomate cv. 'Provence' disminuye la producción de etileno debido a una supresión transcripcional de los genes ACS2, ACS4 y ACO1, que codifican para la actividad de las principales enzimas, ACC-sintasa (ACS) y ACC-oxidasa (ACO), que participan en la síntesis de etileno, mejorando su calidad y retrasando su ablandamiento.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los frutos de guayaba son altamente perecederos; maduran rápidamente después de ser cosechados provocando principalmente una pérdida de firmeza o ablandamiento y cambios en su calidad. Por lo cual, tienen una corta vida poscosecha (5 a 7 días en condiciones ambientales (25 °C) y dos semanas a 10 °C), limitando su mercado de exportación. Se ha descrito que las aplicaciones de calcio y selenio en pre-cosecha ayudan a mantener la firmeza, el calcio ayudando a reducir la pérdida de peso y fortaleciendo los enlaces entre los polisacáridos de la pared celular e inhibiendo la producción de etileno y su acción en diferentes frutas; mientras que el selenio ayuda a disminuir la producción de etileno, retrasando la maduración e incrementando la actividad de enzimas antioxidantes (CAT, SOD) que ayudan a disminuir las especies reactivas de oxígeno reduciendo la peroxidación lipídica y manteniendo la integridad de las membranas celulares. Por lo tanto, es necesario profundizar en el estudio de la firmeza o ablandamiento y la integridad de la membrana celular para proponer alternativas poscosecha para extender su vida de anaquel y permitir aumentar su comercialización en mercados distantes.



#### **4. HIPÓTESIS**

El almacenamiento a baja temperatura altera el metabolismo de lípidos de membrana afectando su permeabilidad y funcionalidad provocando pérdidas en la textura de los frutos; mientras que la aplicación de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en pre-cosecha modulan el proceso de maduración de los frutos manteniendo la resistencia mecánica durante el almacenamiento.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios en la funcionalidad de la membrana celular durante el almacenamiento en frío y la relación con los cambios de textura; así como evaluar las aplicaciones en pre-cosecha de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  para mantener la firmeza de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) cv. 'Media China' durante su almacenamiento y maduración.

### 5.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la integridad de la membrana celular de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) cv. 'Media China'.
- Evaluar los efectos de la aplicación poscosecha de calcio quelado con glicina en la firmeza y maduración de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) cv. 'Media China'.
- Mediante un estudio reológico, identificar el parámetro mecánico que mejor describa el comportamiento a la deformación de los frutos de guayaba.
- Evaluar los efectos de la aplicación pre-cosecha de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en la firmeza y maduración de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) cv. 'Media China'.
- Identificar, mediante técnicas histoquímicas, la relación entre el contenido de Ca con la firmeza de los mismos.
- Evaluar el efecto de la aplicación de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en la actividad de enzimas asociadas a la degradación de pared celular, poligalacturonasa (PG) y pectinmetilesterasa (PME).
- Evaluar el efecto de las aplicaciones de Se en la actividad de enzimas asociadas al proceso de senescencia y estrés oxidativo (catalasa y superóxido dismutasa); en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) cv.

‘Media China’ durante su almacenamiento y relacionarlas con los cambios en la firmeza de los frutos.

- Evaluar los efectos de las aplicaciones de selenio en la actividad de enzimas de degradación de lípidos (lipoxigenasa LOX) y la producción de malondialdehído (MDA) y relacionarlos con los cambios de firmeza.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Origen, cosecha y manejo de los frutos**

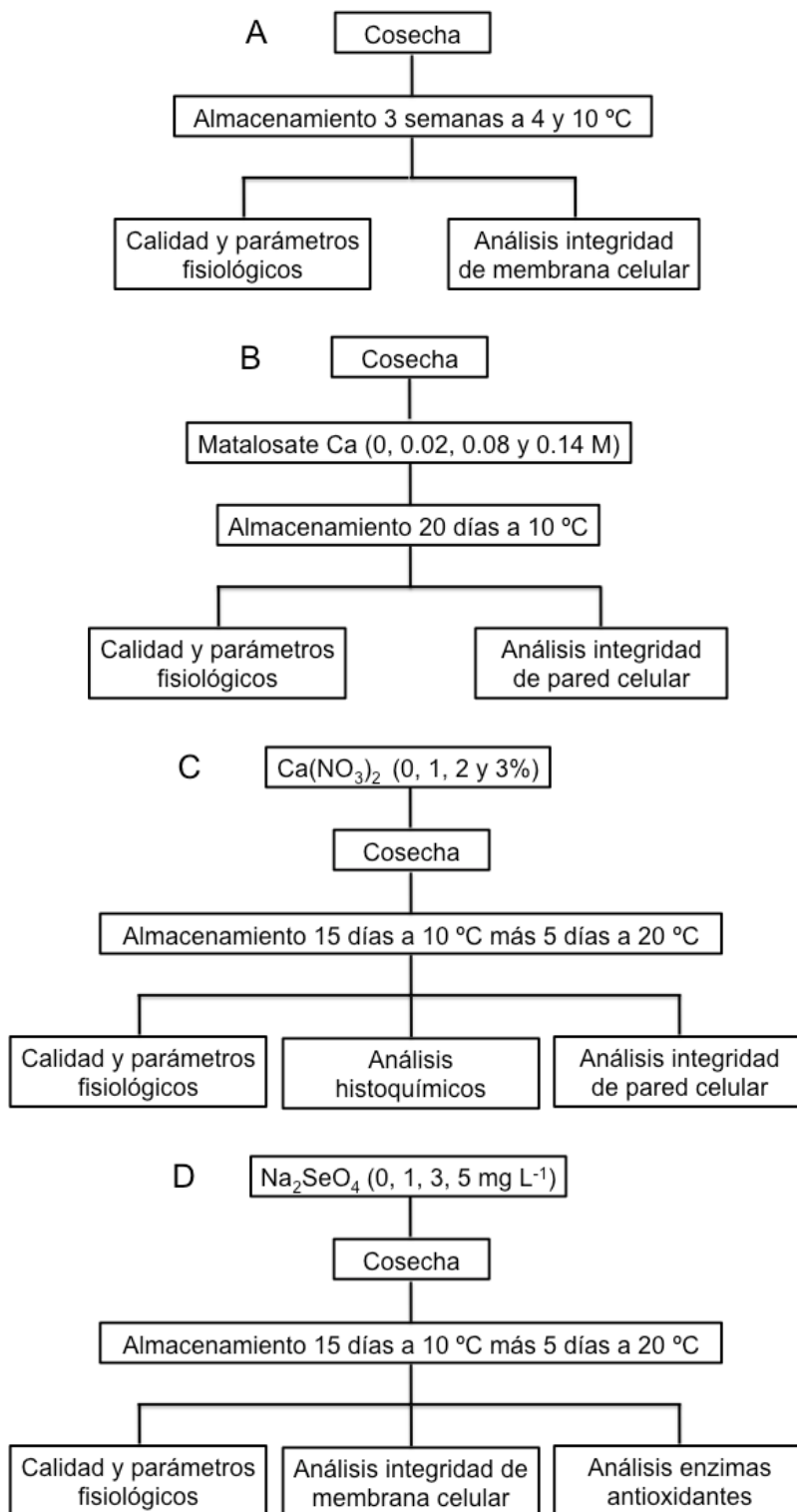
Los frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) de la variedad 'Media China' fueron recolectados en un huerto comercial ubicado en la comunidad "La Florida" del municipio de Jungapeo Michoacán; las cosechas se realizaron en diferentes meses del año y en diferentes temporadas y de acuerdo a los experimentos que se fueron realizando dentro del trabajo doctoral. En cada experimento, los frutos se cosecharon manualmente en madurez fisiológica indicada por un color de piel verde-amarillo de acuerdo a lo sugerido por Mercado-Silva *et al.* (1998). Una vez cosechados, los frutos se colocaron en cajas de cartón protegidas en su base con una capa de material suave para evitar el daño mecánico. Las cajas fueron transportadas al laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. En el laboratorio, los frutos fueron almacenados a 10 °C durante 24 h antes de aplicar los tratamientos.

Los tratamientos en campo fueron realizados en la misma comunidad en dos huertos distintos donde las aplicaciones de los compuestos, las concentraciones estudiadas en los distintos experimentos fueron aplicados por vía foliar en distintos periodos del ciclo de desarrollo del fruto utilizando una moto bomba de aspersion. El número de árboles y su distribución dentro de los huertos se señala en cada uno de los experimentos. Al final del ciclo del cultivo, los frutos se cosecharon y se manejaron de acuerdo a lo señalado en el párrafo anterior.

### **6.2 Estrategia experimental**

El trabajo se dividió en cuatro estudios independientes: En el primero se estudió el efecto de la temperatura de almacenamiento en la respuesta fisiológica e integridad de la membrana celular. En el segundo se estudió el efecto de la aplicación poscosecha de glicina-calcio (Metalosate Calcio) en la calidad y firmeza durante la maduración de los frutos. En el tercero se estudio el efecto de la

aplicación pre-cosecha de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en la respuesta fisiológica e integridad de la pared celular durante la maduración poscosecha de los frutos; y el cuarto abordó el estudio de la aplicación pre-cosecha de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en la respuesta fisiológica e integridad de la membrana celular durante la maduración poscosecha de los frutos. La estrategia experimental seguida se muestra en la Figura 15.



**Figura 15.** Estrategia experimental seguida para el desarrollo de los experimentos de temperatura (A), evaluaciones poscosecha (B) y evaluaciones pre-cosecha (C y D).

## **6.3 Métodos**

### **6.3.1 Aplicación de tratamientos**

#### **6.3.1.1 Efecto de temperatura de almacenamiento**

En un huerto comercial de Calvillo Aguascalientes, México se cosecharon 480 frutos y se dividieron en cuatro grupos de 120 frutos cada uno. Para provocar el daño por frío, un grupo de frutos se almacenó cuatro semanas a 4 °C más tres días a 20 °C; dos grupos de frutos se almacenaron durante tres semanas a 4 y 10 °C (temperatura óptima) y posteriormente fueron transferidos tres días a 20 °C; el cuarto grupo fue el control almacenados 7 días a 20 °C, a estos se les consideró como frutos sin daño.

Después del almacenamiento a 20 °C, se tomaron 40 frutos de cada tratamiento para evaluar la calidad visual (CV), el contenido de proteína (CP), fosfolípidos y volumen de membranas microsomales (VMM), el perfil de lípidos y ácidos grasos, y la actividad de FLD.

#### **6.3.1.2 Tratamiento de frutos con calcio quelado con glicina (Metalosate Calcio) en poscosecha**

En un huerto comercial llamado “El salto” de Jungapeo Michoacán, se cosecharon 180 frutos y fueron manejados de la forma descrita en el apartado anterior. Los frutos fueron agrupados 5 lotes de 45 frutos cada uno y fueron infiltrados bajo vacío con diferentes soluciones de glicina-calcio (Metalosate Ca) (0.00, 0.02, 0.08 y 0.14 M) durante 10 minutos a una presión de vacío de 10 in Hg, los frutos se dejaron secar al ambiente.

A los 0, 5, 10, 15 y 20 días de almacenamiento a 10 °C y 90% HR, se tomaron 12 frutos de cada tratamiento para evaluar la pérdida de peso, firmeza, calidad visual, sólidos solubles totales, acidez titulable y fuga de electrolitos.

### **6.3.1.3 Tratamiento de frutos con nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) en pre-cosecha**

En un huerto comercial llamado “El salto” de Jungapeo Michoacán, se seleccionaron al azar 16 árboles de guayaba ‘Media China’ de edad y vigor uniformes y distribuidos de manera aleatoria dentro del huerto. Las plantas fueron mantenidas bajo el programa de fertilización, irrigación y tratamiento fitosanitario para control de insectos seguido por el productor.

Con los 16 árboles seleccionados, se subdividieron en cuatro conjuntos de cuatro árboles a los que se asperjaron diferentes soluciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (0, 1, 2 y 3% en peso). Las aplicaciones se realizaron cuando los frutos tenían un tamaño de 5 mm de diámetro. La aplicación se realizó en la primera semana de septiembre de 2016, y la cosecha se realizó en Noviembre de 2016. De cada tratamiento se cosecharon 120 frutos y fueron manejados de la forma descrita en el apartado anterior. Después en el laboratorio se almacenaron a 10 °C por distintos periodos de tiempo.

A los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento a 10 °C y 90% HR más 5 días a temperatura ambiente (20 °C) y 75% HR se tomaron 12 frutos de cada tratamiento para evaluar su calidad visual, pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable, actividad enzimática de poligalacturonasa y pectinmetilesterasa, contenido de calcio y análisis históquímico.

### **6.3.1.4 Tratamiento de frutos con selenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) en pre-cosecha**

En un huerto comercial de la comunidad de “La Florida” en Jungapeo Michoacán, se seleccionaron al azar 8 árboles de frutos de guayaba ‘Media China’ completamente al azar, de edad y vigor uniforme. Las plantas fueron mantenidas bajo el programa de fertilización, irrigación y tratamiento fitosanitario para control de insectos recomendado por el productor.

Los 8 árboles seleccionados, se subdividieron en 4 subconjuntos de dos árboles los cuales fueron asperjados vía foliar con diferentes soluciones de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  (0,



1, 3 y 5 mg L<sup>-1</sup>). La aplicaciones se realizaron cuando los frutos se encontraban en un tamaño de 5 mm de diámetro. La aplicación se realizó en la primer semana de marzo de 2017 y la cosecha para el tratamiento de 0 mg L<sup>-1</sup> se realizó a finales de Abril de 2017; los tratamientos de 1, 3 y 5 mg L<sup>-1</sup> se llevó a cabo a finales de mayo de 2017. De cada tratamiento se cosecharon 120 frutos y estos fueron manejados de la forma descrita en el apartado anterior. Los frutos fueron transportados al laboratorio para su almacenamiento y análisis.

A los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento a 10 °C y 90% HR más 5 días a 20 °C y 75% HR, se tomaron 12 frutos de cada tratamiento para evaluar su calidad visual, pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable, actividad enzimática de lipoxigenasa, catalasa, superóxido dismutasa y el contenido de malondialdehído.

## **6.4 Diseño experimental**

Dada la magnitud y número de experimentos, cada uno de ellos fue planeado en forma independiente puesto que los experimentos no se realizaron de manera simultánea.

### **6.4.1 Efecto de temperatura de almacenamiento**

El estudio de la temperatura de almacenamiento se realizó un diseño completamente aleatorizado en un arreglo factorial con dos factores: temperatura de almacenamiento con tres niveles (4, 10 y 20 °C) y tiempo de almacenamiento (7, 17 y 24 días). La unidad experimental consistió de 40 frutos por replica y se tomaron tres replicas por temperatura, a los cuales se les determinaron las variables respuesta.

#### **6.4.2 Tratamiento de frutos con calcio quelado con glicina (Metalosate Calcio) en poscosecha**

El estudio de los tratamientos poscosecha se realizó aplicando un diseño completamente aleatorizado en un arreglo factorial con dos factores: tratamiento con cuatro niveles (0.00, 0.02, 0.08 y 0.14 M) y tiempo de almacenamiento (0, 5, 10, 15 y 20 días). Los análisis se realizaron en forma independiente para cada periodo de muestreo (0, 5, 10, 15 y 20 días a 10 °C). La unidad experimental consistió de 1 fruto por replica y se tomaron 9 réplicas por tratamiento, a los cuales se les determinaron individualmente las variables respuesta.

#### **6.4.3 Tratamiento de frutos con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ en pre-cosecha**

El estudio de los tratamientos pre-cosecha se realizó aplicando un diseño completamente aleatorizado en un arreglo factorial con dos factores: tratamiento con cuatro niveles (0, 1, 2 y 3%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) (0, 1, 3 y 5 mg L<sup>-1</sup>  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) y tiempo de almacenamiento (0, 5, 10, 15 y 20 días). Los análisis se realizaron en forma independiente para cada periodo de muestreo (0, 5, 10 y 15 días a 10 °C y su respectiva transferencia a 20 °C). La unidad experimental consistió de 1 fruto por replica y se tomaron 12 réplicas por tratamiento, a los cuales se les determinaron individualmente las variables respuesta.

### **6.5 Métodos utilizados**

#### **6.5.1 Calidad Visual**

Para poder evidenciar los cambios en la calidad visual de cada uno de los tratamientos, se tomaron fotografías de los frutos intactos en cada uno de los muestreos por medio de una cámara digital (OLYMPUS, TG-610).

## 6.5.2 Métodos fisiológicos

### 6.5.2.1 Pérdida de peso

La pérdida de peso se evaluó como indicador de pérdida de agua debida a la transpiración de los frutos. Se pesaron los frutos individualmente al inicio y después cada muestreo en una balanza digital (Ohaus Scout Pro 400 g x 0.01 g); la diferencia de peso inicial ( $P_i$ ) y final ( $P_f$ ) de cada fruto representó el peso perdido durante el almacenamiento el cual se comparó con el peso inicial y se expresó como porcentaje de pérdida de peso haciendo uso de la siguiente expresión (Mahajan *et al.*, 2011):

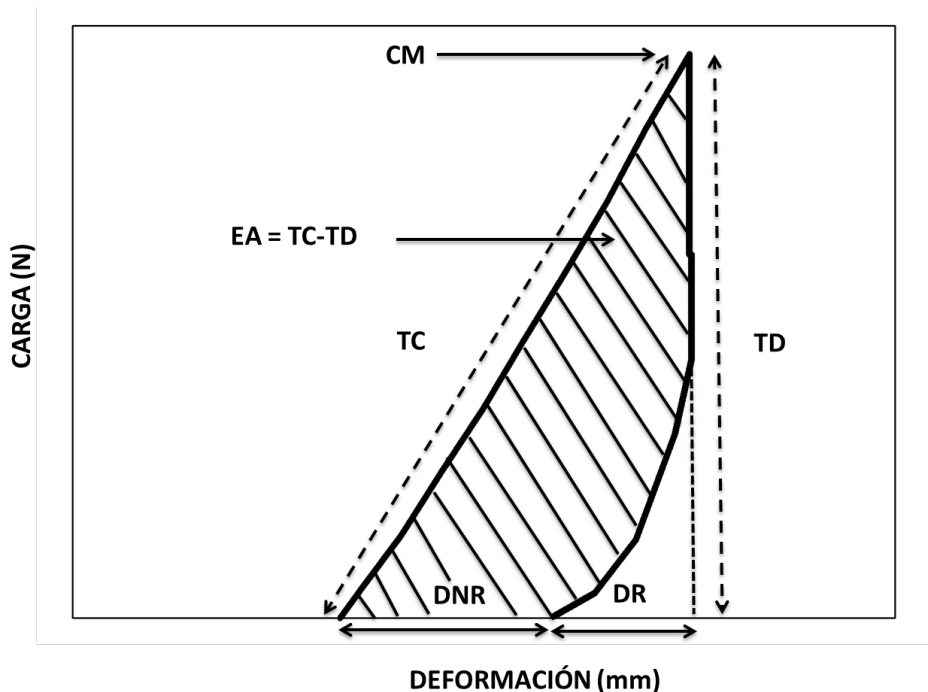
$$\%PP = \left( \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \right) \times 100$$

### 6.5.2.2 Firmeza de los frutos y análisis de la resistencia mecánica

Para los tratamientos en poscosecha de metalosate Ca, la firmeza se determinó mediante una prueba de compresión (Cheng-Chang y Ching-Hua, 2013) en un texturómetro TA-HD (Stable Micro Systems) equipado con una sonda cilíndrica plana de aluminio de 50.8 mm de diámetro y 20 mm de altura, con las condiciones siguientes: velocidad de prueba 2 mm s<sup>-1</sup>, hasta alcanzar 3% de deformación respecto del diámetro ecuatorial máximo del fruto; registrándose la fuerza máxima en newtons (N) necesaria para alcanzar dicha deformación.

Los frutos son materiales viscoelásticos, los cuales combinan características de sólidos y líquidos, y su deformación está en función del tiempo en que se aplique un esfuerzo. Para poder estudiar su comportamiento mecánico se realizó una prueba de esfuerzo-relajación, utilizando un texturómetro CT3 25K (Brookfield CT3) equipado con una sonda cilíndrica plana de aluminio de 50.8 mm de diámetro y 20 mm de altura que comprimió el fruto a una velocidad de 1 mm s<sup>-1</sup> hasta alcanzar una deformación de 3 mm respecto del diámetro ecuatorial máximo. Alcanzada esa deformación la sonda se detuvo y mantuvo la compresión

durante 3 minutos. A partir de los reogramas o de la curva de esfuerzo-relajación se calculó la carga máxima (CM) reportada en newtons, deformación recuperable (DR) y no recuperable (DNR) reportada en mm y energía absorbida (EA) medida en mJ; como se muestra en la Figura 16 (Mohsenin, 1970).



**Figura 16.** Reograma de frutos de guayaba sometidos a una prueba de esfuerzo-relajación y parámetros analizados: Carga máxima (CM), Deformación recuperable (DR), Deformación no recuperable (DNR), Energía absorbida (EA), Trabajo de carga (TC), Trabajo de descarga (TD).

### 6.5.2.3 Contenido de Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales para este estudio, se tomaron únicamente como indicador de madurez y se midieron siguiendo el método 932.12 de la A.O.A.C (2005). A 5 g de pulpa se añadieron 10 mL de agua destilada, se homogenizaron en un homogenizador ULTRA-TURRAX T25 durante 30 s a 13500 rpm; una gota del homogenizado fue colocada en un refractómetro Hanna Instruments HI 96801, previamente calibrado con agua destilada a temperatura constante de 20 °C y se registraron los datos como °Brix considerando el factor de dilución.

#### 6.5.2.4 Acidez titulable

La acidez titulable es también un indicador de madurez y se midió de acuerdo al método de la AOAC (2005). Se homogeneizaron 5 g de pulpa del fruto con 30 mL de agua destilada el cual posteriormente fue filtrado. Se tomaron 10 mL del filtrado y se colocaron en un matraz Erlenmeyer, y se adicionaron 2 gotas de fenolftaleína (1% p/v en etanol), la mezcla fue titulada con una solución de NaOH 0.1 N hasta obtener un vire de incoloro a rosa. El contenido de acidez fue calculado por la siguiente expresión, reportándose como gramos de ácido cítrico por 100 g de muestra:

$$g \text{ de ácido cítrico} = \frac{(mL \text{ NaOH})(0.01N)(meq \text{ ácido cítrico})}{100 \text{ g}} \times 100$$

#### 6.5.2.5 Índice de maduración (RPI)

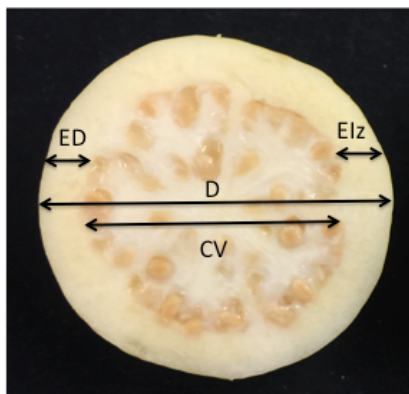
El desarrollo del proceso de maduración de los frutos se caracteriza por los cambios en sólidos solubles totales (SST) y acidez titulable (AT); no obstante, también está determinado por la pérdida de la firmeza de los frutos, la cual se puede monitorear por la carga máxima (CM) derivada de la prueba de relajación. El RPI, por sus siglas en inglés (ripening index), es un parámetro que involucra las propiedades físicas y químicas de las frutas asociada con la percepción sensorial de su maduración (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2005). Para su cálculo se utiliza la siguiente expresión:

$$RPI = \ln \left( 100 \times CM \times \left( \frac{AT}{SST} \right) \right)$$

#### 6.5.2.6 Dimensiones internas del fruto

Todos los frutos fueron utilizados en los diferentes experimentos fueron seleccionados con un diámetro máximo alrededor de 5 cm. Debido a que las dimensiones del pericarpio y de la cavidad de alojamiento de las semillas pueden tener un efecto en las mediciones de la firmeza; a todos los frutos se les midió el

diámetro máximo externo o diámetro ecuatorial (D), el espesor del pericarpio derecho (ED) e izquierdo (Elz), y la cavidad (CV) utilizando un vernier digital (SURTEK) (Figura 17). Los datos fueron utilizados para realizar estudios de correlación y estimar su influencia en la resistencia mecánica de los frutos.



**Figura 17.** Dimensiones internas de los frutos con posible influencia en la resistencia mecánica del fruto de guayaba 'Media China'.

#### **6.5.2.7 Contenido total de compuestos fenólicos**

El contenido total de compuestos fenólicos se determinó mediante el método descrito por Folin y Ciocalteu modificado por Singleton y Rossi (1965). 200  $\mu\text{L}$  de la muestra, previamente diluida (1:10), se hicieron reaccionar con 1 mL de agua destilada y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu durante 5 a 8 minutos en un ambiente en ausencia de luz. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7% (p/v) y 1.6 mL de agua destilada. Se agitó y permaneció en incubación a temperatura ambiente durante 1 h. Se leyó su absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (JENWAY, 6305, United King), empleando como blanco agua destilada. La cuantificación del contenido de polifenoles totales se realizó con una curva de calibración de ácido gálico de 0.02 a 0.12  $\text{mg mL}^{-1}$ .

#### **6.5.2.8 Capacidad antioxidante**

La actividad antioxidante se calculó mediante el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). A 100  $\mu\text{L}$  de muestra, previamente diluida (1:10), se le adicionaron 2.9 ml de la solución de DPPH, se agitó vigorosamente y se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro (marca JENWAY, modelo 6305, Bibby Scientific, United King) a 517 nm, empleando como blanco metanol al 80% (v/v). La determinación de la actividad antioxidante se realizó con una curva de calibración de Trolox de 0.1 a 0.6  $\mu\text{mol EqTrolox mL}^{-1}$ .

#### **6.5.2.9 Perfil de compuestos fenólicos por HPLC**

Para la identificación de los compuestos fenólicos se empleó el método descrito por Flores *et al.* 2013, con modificaciones. Para la extracción se utilizaron 0.2 g de muestra liofilizada con 2 mL de metanol-agua (50:50) acidificado con 1% de ácido acético. Se colocó en un vortex y se dejó por un minuto, posteriormente se hizo una extracción ultrasónica durante 15 min y se centrifugó por 15 min. Se filtraron las muestras con un filtro 0.22  $\mu\text{m}$ . La separación se llevó a cabo en un equipo Merck Hitachi L-6200 con detector Waters 996 de arreglo de diodos, usando una columna C18 (5 $\mu\text{m}$ x250mm, Symetry) a 30°C. Se utilizaron dos fases móviles: fase A (agua grado HPLC-1% de ácido fórmico) y fase B (100% acetonitrilo) con un gradiente lineal como se establece en la Tabla 3. El tiempo de corrida para cada muestra fue de 30 min a un flujo de 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ , el volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$  del extracto.

**Tabla 3. Gradiente de separación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD.**

| <b>Minuto</b> | <b>Flujo (mL/min)</b> | <b>% A</b> | <b>% B</b> |
|---------------|-----------------------|------------|------------|
| 0             | 0.8                   | 90         | 10         |
| 5             | 0.8                   | 80         | 20         |
| 10            | 0.8                   | 70         | 30         |
| 20            | 0.8                   | 60         | 40         |
| 30            | 0.8                   | 60         | 40         |

Se realizó la cuantificación de los compuestos fenólicos en fracciones individuales en base a una curva estándar de ácido gálico.

### **6.5.3 Métodos bioquímicos. Actividades enzimáticas asociadas al metabolismo de la pared celular.**

#### **6.5.3.1 Obtención del extracto enzimático**

El extracto de enzimas se obtuvo mediante el método descrito por Carabalí *et al.* (2009), con ligeras modificaciones. Cinco gramos de la pulpa del fruto de guayaba se molieron en un homogenizador ULTRA-TURRAX T25 durante 1 min a 13500 rpm, con 20 mL de buffer de extracción (citrato-fosfato 0.1M, NaCl 0.1M, DTT (ditiotreitól) 1mM, pH 7). Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se filtró mediante vacío y constituyó el extracto utilizado para la cuantificación de proteína y la actividad de pectinmetilesterasa y poligalacturonasa.

#### **6.5.3.2 Actividad de Pectinmetilesterasa (PME)**

La enzima PME hidroliza el enlace éster de las pectinas generando metanol, y el C-6 presente en los residuos de ácido galacturónico de las pectinas se transforma en un grupo carboxilo. La disociación de este grupo carboxilo genera



protones que producen un descenso en el pH del medio de reacción, lo cual nos indica una mayor degradación de las pectinas (Guillermo, 2007).

Se preparó una mezcla de reacción con 2.5 mL de extracto enzimático y 25 mL de pectina cítrica de alto metoxilo al 1 % y NaCl 0.2 M a pH 7.0 ajustando con NaOH 0.01 N. La mezcla de reacción se incubó a 30 °C por 20 min. La actividad de la PME se determinó por cuantificación de los grupos carboxilo liberados por la PME mediante su titulación por neutralización con NaOH 0.01 M. Para esto se midió el volumen de hidróxido de sodio necesario para ajustar el pH nuevamente a 7.0. Se realizaron blancos de sustrato y de extracto, en los cuales se mantuvieron las mismas condiciones de incubación y de cuantificación que en la mezcla de reacción. La unidad de actividad específica de PME fue definida como los moles de hidrógeno liberados por min por kg de proteína (Carabalí *et al.*, 2009).

#### **6.5.3.3 Actividad de Poligalacturonasa (PG)**

La actividad de PG se determinó mediante la cuantificación del ácido galacturónico liberado por la enzima después de un tiempo de reacción sobre un sustrato de ácido poligalacturónico. La cuantificación se realizó por espectrofotometría mediante el método reportado por Da Costa Raposo y Finardi Filho (2005), con algunas modificaciones. 100 µL de extracto enzimático que se incubaron con 0.3 mL de ácido poligalacturónico al 0.5% v/v, durante 30 min a 37 °C. Transcurridos los 30 min, la reacción se detuvo utilizando 2 mL de buffer borato (0.1 M. pH 9) y 0.4 mL de cianocetamida al 1% v/v. Después de parar la reacción, la mezcla se homogenizó y se llevó a ebullición por 10 min. Posteriormente, se enfrió y se midió la absorbancia a 276 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40. La liberación de unidades de ácido galacturónico se determinó con base en una curva patrón de ácido galacturónico (0 a 48 µg) y la actividad específica se expresó en unidades de ácido galacturónico liberado por kg de proteína en un minuto de reacción ( $\text{mol kg}^{-1}$  de proteína  $\text{min}^{-1}$ ).

#### **6.5.3.4 Cuantificación de proteína**

Para estimar la actividad específica de las enzimas se cuantificó la proteína por el método de Bradford (1976). Se preparó una solución estándar de sero albúmina bovina a una concentración de 1 mg/mL, a partir de esta solución, se preparó una curva de calibración de 0 a 100 µg, ajustando el volumen a 1 mL. Para el blanco, se utilizó únicamente agua destilada. Tanto para la curva de calibración como para las muestras, se utilizaron 100 µL del extracto y se adicionaron 5 mL del reactivo de Bradford. A los 5 min de reacción, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40 (Bradford, 1976; Kruger, 2002); con este dato y la curva de calibración se obtuvo la cantidad de proteína en el extracto.

#### **6.5.4 Contenido de calcio**

El contenido de calcio fue determinado en la pulpa del fruto después de la cosecha. 120 g de pulpa de fruta de cada uno de los tratamientos de calcio se liofilizaron y pulverizaron. El polvo fue utilizado para ser digerido en una mezcla 2:1 de HNO<sub>3</sub> y HClO<sub>4</sub> y la solución obtenida fue analizada por espectrometría de absorción atómica (Minamide *et al.*, 1986).

#### **6.5.5 Análisis histoquímico de Ca**

La presencia de calcio en los tejidos de guayaba se realizó mediante el método de tinción con ácido tánico-cloruro férrico siguiendo la metodología de Sandoval, 2005. Se obtuvieron secciones en forma triangular del endocarpo de dos frutos de guayaba por tratamiento. A esas secciones se les realizó un corte transversal de 200 µm mediante un micrótopo manual (R. Jung Ag Heidelberg, 20175). Se colocó el material sobre una solución acuosa de ácido tánico al 1% por 10 min. Posteriormente se lavó en una corriente de agua destilada por 10 min, después se colocó en cloruro férrico al 3% por 5 a 10 min, se lavó con agua destilada y se

observó al microscopio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, 176045). La pared celular con calcio debía teñirse de color negro o azul oscuro (Sandoval, 2005).

## **6.5.6 Análisis de la integridad de la membrana celular**

### **6.5.6.1 Fuga de electrolitos**

La fuga de electrolitos evalúa la pérdida de integridad de las membranas durante la maduración de los frutos. Esta estimación se realiza mediante la comparación de la conductividad o liberación de iones a un medio acuso respecto de la liberación de iones totales cuando las membranas son destruidas. 10 discos (14 mm de diámetro) de la pulpa de los frutos de guayaba se incubaron en 25 mL de agua desionizada por 3, 6, 12, 30 y 60 minutos y se midió su conductividad con un conductímetro (El-Hama Instruments Ltd., El-Hama, Israel). La conductividad total se determinó en muestras similares congeladas por 24 h, se descongelaron a temperatura ambiente y se llevaron a ebullición en 25 mL de agua destilada por 15 minutos, se reajustó su volumen y se midió la conductividad. La pérdida de electrolitos se expresó como porcentaje de conductividad respecto a la conductividad total (Maalekuu *et al.*, 2006).

### **6.5.6.2 Separación de membranas microsomales**

Para poder analizar los cambios en la composición de las membranas durante la maduración de los frutos de guayaba se separaron las membranas microsomales de acuerdo a la técnica de partición de fases descrita por González de la Vara y Medina (1988). 120 g de la pulpa de guayaba fueron homogenizados en una licuadora por 30 segundos con una solución extractora (250 mM de Sacarosa, 4.0 mM de 1-4 ditiotreitól (DTT), 0.5 mM de sal sódica del etilen-diamino tetra-acético (EDTA), 0.1% (p/v) de albúmina de suero de bovino, 0.5% (p/v) de polivinilpirrolidona insoluble y 70 mM de hidroxiaminometano/ácido clorhídrico (Tris/HCl), pH 8, a 4 °C) y el homogenizado fue filtrado al vacío sobre tela de algodón y centrifugado a 9 000 rpm por 15 min; el sobrenadante fue nuevamente

centrifugado a 10 000 rpm por 2.5 h y el residuo de esta fracción representó la fracción de las membranas microsomales. Posteriormente fueron resuspendidas con 1.6 mL de una solución reguladora (250 mM de sacarosa, 20 mM de DTT y 50 mM de hidroximetilaminometano y ácido morfolinoetanosulfónico (Tris/MES), pH de 6.5). Estas muestras fueron almacenadas a -80 °C para posteriormente analizar su contenido de proteínas, lípidos, fosfatos de fosfolípidos y actividad de FLD.

#### **6.5.6.3 Contenido de proteína en membranas microsomales**

Uno de los componentes dentro de las membranas celulares son las proteínas, las cuales durante la maduración de los frutos su contenido decrece en consecuencia de la pérdida de la integridad de las membranas. El contenido de proteína se determinó por el método reportado por Bradford (1976). Se preparó una solución estándar de sero albúmina bovina a una concentración de 1 mg/mL, a partir de esta solución, se preparó una curva de calibración de 0 a 100 µg, ajustando el volumen a 1 mL. Para el blanco, se utilizó únicamente agua destilada. Tanto para la curva de calibración como para las muestras, se utilizaron 5-10 µL de las membranas microsomales y se colocaron en un tubo Eppendorf y se agregaron 5 µL de desoxicolato al 0.2%, se agitó y dejó reposar por 10 min; posteriormente se agregaron 25 µL de NaOH 0.1 N, se mezcló y se dejó reposar por 10 min, se agregó agua destilada hasta 500 µL, se mezcló y adicionaron 500 µL del reactivo de Bradford. A los 5 min de reacción, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40 (Bradford, 1976; Kruger, 2002); con este dato y la curva de calibración se obtuvo la cantidad de proteína en el extracto.

#### **6.5.6.4 Contenido de fosfolípidos**

Los fosfolípidos son los componentes mayoritarios de las membranas celulares, los cuales sufren cambios o se degradan durante la maduración de los

frutos. El contenido de fosfatos se determinó de acuerdo al método reportado por Ames (1966) y su conversión a fosfolípidos fue hecho suponiendo un peso molecular promedio de 760, el cual corresponde a la fosfatidilcolina. 50  $\mu$ L de membranas microsomales se colocaron en un tubo de vidrio con 250  $\mu$ L de ácido perclórico y fueron calentadas hasta digestión completa de la materia orgánica, el residuo se dejó enfriar y se recuperó con 5 mL de agua. Posteriormente se filtró y el filtrado se llevó a un matraz aforado de 10 mL. Para medir la cantidad de fosfatos, se tomaron alícuotas de 1 mL a las cuales se les agregó el reactivo de Ames (1.2 mL de molibdato de amonio al 0.42% en ácido sulfúrico 1 N con 0.2 mL de ácido ascórbico al 10% y 0.48 mL de agua), se agitó y se mantuvo 45 min a 30 °C, para permitir el desarrollo de color, y se midió la absorbancia a 820 nm. Los resultados fueron calculados mediante una curva estándar utilizando 1 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de alta pureza.

#### **6.5.6.5 Extracción, separación y cuantificación de lípidos**

Para poder identificar que tipo de lípidos se encuentran en las membranas celulares de los frutos de guayaba, se realizó una extracción de los lípidos mediante el método reportado por Bligh y Dyer (1959), con modificaciones de Whitaker (1988). 200  $\mu$ L de las membranas microsomales se mezclaron con 2.5 mL de isopropanol, y fueron calentadas por 15 min a 70 °C, se enfriaron a temperatura ambiente y se agregaron 5 mL de la mezcla de cloroformo metanol 2:1 v/v que fue calentada a 70 °C por 15 min y filtrada. Al filtrado se le agregaron 0.5 mL de solución de KCl al 0.88%, se agitó y fue separada la fase polar y el residuo se lavó dos veces con 3 mL de la mezcla metanol agua 1:1 v/v. La fase polar se llevó a sequedad a 60 °C en atmósfera de  $\text{N}_2$  y el residuo fue almacenado a -20°C.

Para la separación por cromatografía de capa fina, el residuo con el contenido de los lípidos, fue recuperado con 500  $\mu$ L de cloroformo, se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L y se aplicaron a una placa cromatográfica de sílica gel 60 (Merck). La separación de lípidos se realizó dentro de una cámara cromatográfica utilizando

una solución de cloroformo:metanol:ácido acético:agua (160:40:8:4) y 5  $\mu\text{L}$  de estándares de fosfolípidos (mg/mL), ácido fosfático (AF), fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilglicerol (FG), fosfatidilinositol (FI), cardiolipina (CL), monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y digalactosildiacilglicerol (DGDG). Posteriormente las placas se secaron en una corriente de  $\text{N}_{2(\text{g})}$  y se revelaron con solución de 2.7 fluoresceína al 0.1% en metanol. Los lípidos fueron identificados con estándares y con una lámpara de luz UV y separados con una espátula de acero inoxidable y colocados en un tubo de ensayo con tapa de rosca.

La cuantificación se realizó en fracciones separadas que fueron recuperadas con 2 mL de éter de petróleo y derivatizadas, se agregaron 2 mL de solución de  $\text{BF}_3$  al 12% (Metcalf *et al.*, 1996) y 10  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de ácido heptadecanoico C17:0 como estándar interno, dicha mezcla fue calentada a 70 °C por 15 min, y enfriada a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 1 mL de agua destilada, se volvió a agitar y se dejó reposar para conseguir que se separaran dos fases. La fase polar fue extraída y secada en atmósfera de  $\text{N}_{2(\text{g})}$ , el residuo (metil esteres) se recuperó en 50  $\mu\text{L}$  de éter conteniendo antioxidante BHT al 0.01%. La cuantificación de ácidos grasos fue realizada por cromatografía de gases; se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en una columna Innowax, en una rampa de temperatura de 120-250 °C, con un tiempo inicial de 1 min, incrementando la temperatura de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  y la temperatura final se mantuvo por 5 min. Las temperaturas del inyector y detector FID fueron de 250 y 275 °C, respectivamente, con una velocidad de registro de 0.7  $\text{cm min}^{-1}$ , la atenuación de 2 con área de rechazo de 2000. Los tiempos de retención se ubicaron utilizando patrones de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos insaturados previamente derivatizados.

#### **6.5.6.6 Enzima Fosfolipasa D**

La enzima fosfolipasa D se ha reportado como la principal degradadora de los fosfolípidos y recambio en la composición de las membranas celulares (Dyer *et al.*, 1994). La actividad de la fosfolipasa D se determinó de acuerdo al método reportado por Clermot y Douce (1970). 50  $\mu\text{L}$  de membranas microsomales fueron

colocadas en tubos de ensayo con 1.25 mL de buffer de acetatos 0.1 M de pH 5.6 y 0.5 mL de  $\text{CaCl}_2$  60 mM, se agitaron por 15 s y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de fosfatidilcolina (25 mg/mL de éter), se agitaron nuevamente y se incubaron 1 h a 30 °C, al final, la cantidad de fosfatidilcolina residual fue extraída y cuantificada de manera similar a los lípidos de las membranas microsomales. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{moles}$  de colina liberado por mg de proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> y fue utilizado como patrón de actividad de fosfolipasa D de 2500 unidades.

#### **6.5.6.7 Lipoxigenasa (LOX)**

El extracto se obtuvo mediante el método reportado por Mondal *et al.* (2009), con ligeras modificaciones. 4 g del tejido se homogeneizaron en un homogenizador ULTRA-TURRAX T25 durante 1 min a 10000 rpm, en 10 mL de buffer de extracción (fosfato 0.01M pH 7.5, 5% (p/v) polivinilpirrolidona (PVPP), 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C durante 20 min. Se utilizó 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 2 mL de etanol absoluto y 7 mL de etanol al 60%, y se centrifugó 15 min a 10000 rpm. El sobrenadante se consideró como el extracto enzimático. Una muestra del sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de proteína.

Para la preparación del sustrato, se mezclaron 466  $\mu\text{L}$  de ácido linolénico, 466  $\mu\text{L}$  de Tween 20 y 10 mL de agua destilada. Esta mezcla fue clarificada con 1 mL de NaOH 1N por 10 min a 25 °C. La solución fue llevada a 200 mL de buffer fosfato pH 7 (Surrey, 1964).

Para la mezcla de reacción se utilizó 1 mL de extracto enzimático y 3 mL de la solución sustrato. La actividad de LOX fue medida a 30 °C por 3 min. El cambio en la absorbancia fue medida a 234 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40. Una unidad de actividad específica de LOX específica fue considerada como un  $\mu\text{mol}$  de hidropéroxido de ácido linolénico producido por minuto por mg de proteína ( $\mu\text{mol}$  hidropéroxido ácido linolénico min mg proteína<sup>-1</sup>) (Anthon y Barret, 2000).

### **6.5.6.8 Contenido de malondialdehído (MDA)**

El contenido de MDA fue determinado por el método descrito por Heath y Pecker (1968). Un gramo de tejido fue homogenizado en 5 mL de 0.1% (p/V) ácido tricloroacético (TCA) y centrifugado 15 min a 10000 rpm a 4 °C. 1 mL del sobrenadante fue mezclado con 4 mL de 20% (p/V) TCA conteniendo 0.5 % (p/V) ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y la mezcla fue incubada a 95 °C por 30 min. Las muestras fueron enfriadas rápidamente en hielo, centrifugadas por 15 min a 10000 rpm a 4 °C midiéndose la absorbancia del sobrenadante a 532 y 600 nm. La concentración de MDA fue calculada utilizando el coeficiente de extinción molar de MDA de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Mondal *et al.*, 2009).

### **6.5.7 Análisis de enzimas antioxidantes**

#### **6.5.7.1 Catalasa (CAT)**

La actividad de catalasa fue determinada por el método descrito por Blackwell *et al.*, (1990), con ligeras modificaciones. Cinco gramos de fruta congelada fueron homogenizados en 50 mL de acetona a 4 °C y se filtraron. El residuo se lavó dos veces con 25 mL de acetona a 4 °C y se dejó secar. El polvo seco sirvió de base para extraer la enzima. 0.5 gr de polvo de acetona se homogeneizaron con 10 mL de buffer de extracción (0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) y después centrifugado por 20 min a 10000 rpm a 4 °C. El sobrenadante constituyó el extracto enzimático.

La mezcla de reacción contenía 2.7 mL de 10 mM Tris/HCl pH 8.5 y 0.1 mL de 0.88%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 100 mM Tris/HCl pH 8.5; a la cual se agregó 0.2 mL de extracto enzimático. La actividad de catalasa fue monitoreada a 240 nm por 10 min a temperatura ambiente (24-26 °C) con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40. Una unidad de actividad de CAT específica fue reportada como la descomposición de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto por gramo de proteína ( $1 \mu\text{mol} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g proteína}^{-1}$ ) (Rivera-Pastrana *et al.*, 2013).



### **6.5.7.2 Superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad de superóxido dismutasa fue determinada de acuerdo al método de Tejacal *et al.*, (2005). La actividad de SOD, fue determinada mediante la inhibición de la reducción fotoquímica del azul de nitrotetrazolio (NBT). La enzima fue extraída de 0.5 gr de polvo de acetona, homogenizado con 10 mL de buffer fosfato 50 mM pH 7.8 y centrifugado 20 min a 10000 rpm a 4 °C. El sobrenadante constituyó el extracto enzimático. El buffer de reacción consistió de 27 mL de buffer fosfato 50 mM pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 1.5 mL de solución de L-metionina (30 mg mL<sup>-1</sup>), 1 mL de NBT (1.41 mg mL<sup>-1</sup>) y 0.75 mL de solución X-100 triton al 1%.

Para la reacción a 0.03 mL de solución de riboflavina (4.4 mg 100 mL<sup>-1</sup>), se añadió 0.4 mL de extracto enzimático y 2.57 mL del buffer de reacción, y posteriormente fue expuesta a luz fluorescente emitida por una lámpara de 20 W por 15 min a temperatura ambiente (24-26 °C), y la absorbancia fue medida a 560 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40. Una unidad de actividad específica de SOD fue definida como la concentración de extracto enzimático que inhibe 50 % la formación de NBT por minuto por gramo de proteína (U min<sup>-1</sup> g proteína<sup>-1</sup>) (Rivera-Pastrana *et al.*, 2013).

### **6.5.8 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en cada uno de los experimentos, fueron analizados estadísticamente a través de un análisis de varianza para comparar el efecto de los tratamientos mediante la comparación de medias a través de la diferencia significativa (LDS) a través de la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico JMP 8.0.1.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Efecto de temperatura de almacenamiento

#### 7.1.1 Componentes de la membrana celular

Los frutos de guayaba con severo daño presentaron una reducción en el contenido de proteína y fosfolípidos, así mismo en el volumen de membranas microsomales (47, 22 y 5 %), respecto a los frutos sin daño. Por su parte, los frutos almacenados a 4 °C y 10 °C presentaron una reducción en el contenido de proteína y fosfolípidos respecto a los frutos sin daño, mientras que en el volumen de membranas microsomales los frutos almacenados a 10 °C presentaron valores similares a los frutos sin daño (Tabla 4). Esto podría indicarnos que los frutos con severo daño por frío y almacenados a 4 °C están induciendo la pérdida de integridad de la membrana celular. Además, los frutos almacenados a 10 °C, al mantener el volumen de membranas microsomales similar a los frutos sin daño, podría estar indicando que esta temperatura disminuye el daño, incrementa su vida poscosecha y siguen un proceso normal de maduración. Un comportamiento similar fue reportado en melón, en donde se observó que conforme avanza el proceso de maduración, el contenido de fosfolípidos disminuye, y esto se correlacionó con la pérdida en la integridad de la membrana (Lacan y Baccou, 1996). Por otro lado, se han reportado cambios en las proteínas de membrana durante el proceso de senescencia de manzana (*Malus domestica* Borkh cv. Golden Delicious), ya que se observa una reducción del 30% de las proteínas en frutos senescentes (25 µg/gpf), mientras que en frutos no senescente el contenido de proteína fue mayor (37.5 µg/gpf), señalando que dicha reducción de proteínas se relaciona con una pérdida en la integridad de la membrana celular (Paliyath y Poovaiah, 1985).

**Tabla 4.** Contenido de proteína, volumen de membranas microsomales y contenido de fosfolípidos de frutos de guayaba sin daño por frío (siete días a 20 °C), con severo daño por frío (4 semanas a 4 °C), y almacenados a 4 y 10 °C por 3 semanas.

| Temperaturas             | Proteína<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Membranas<br>Microsomales<br>( $\mu\text{L g}^{-1}$ ) | Fosfolípidos<br>( $\text{mg mL}^{-1}$ ) |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Fruta sin daño           | 7.60 <sup>a</sup>                    | 2.03 <sup>a</sup>                                     | 19.21 <sup>a</sup>                      |
| Fruta con<br>severo daño | 4.04 <sup>c</sup>                    | 1.93 <sup>b</sup>                                     | 15.06 <sup>c</sup>                      |
| 4 °C                     | 4.83 <sup>b</sup>                    | 1.98 <sup>b</sup>                                     | 16.73 <sup>b</sup>                      |
| 10 °C                    | 4.74 <sup>b</sup>                    | 2.03 <sup>a</sup>                                     | 16.51 <sup>b</sup>                      |

<sup>a</sup> Valores con la misma letra minúscula en la misma columna son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

### 7.1.2 Cambio en el perfil de lípidos y ácidos grasos

Durante el almacenamiento a bajas temperaturas se observaron cambios importantes en los lípidos de la membrana. El total del contenido de ácidos grasos en membranas microsomales de frutos con severo daño por frío y almacenados a 4 y 10 °C, fueron reducidos 44%, 41% y 41%, respectivamente comparado con los frutos sin daño (Tabla 5). Los niveles totales de ácidos grasos en MGDG en frutos con severo daño y almacenados a 4 y 10 °C fueron reducidos 73%, 9% y 50% respectivamente comparado con los frutos sin daño. Mientras que el DGDG no fue detectado en frutos con severo daño y almacenados a 4 °C; de manera interesante el almacenamiento a 10 °C incrementó 30% del total de ácidos grasos en DGDG comparado con frutos sin daño. Sin embargo, los niveles de fosfolípidos (FI, FC, FG, FE, CL y AF) en frutos bajo severo daño por frío fueron reducidos entre el 15-71% comparado con frutos sin daño (Tabla 5). Similarmente los frutos almacenados a 4 y 10 °C mostraron una reducción en el contenido de fosfolípidos entre 8-71% y 6-68%, respectivamente. Estos resultados podrían indicar que la funcionalidad de las membranas está comprometida durante el almacenamiento a bajas temperaturas, especialmente el almacenamiento de los frutos de guayaba a 4 °C.

El contenido total de ácidos grasos saturados en frutos con severo daño por frío y almacenados a 4 y 10 °C fueron reducidos 67%, 77% y 67%

respectivamente, comparado con frutos sin daño por frío. Los niveles de ácidos grasos saturado en MGDG de frutos con severo daño y almacenados a 4 y 10 °C disminuyó 67%, 61% y 17%, respectivamente, comparado con frutos sin daño. Similarmente el DGDG no fue detectado en frutos con severo daño y almacenados a 4 °C; mientras que los frutos almacenados a 10 °C, el DGDG incrementó 131% comparado con fruta sin daño por frío. Sin embargo, los niveles de fosfolípidos (FI, FC, FG, FE, CL y AF) en frutos con severo daño por frío y almacenada a 4 y 10 °C fueron reducidos entre 34-82%, 61-88% y 51-98%, respectivamente, comparados con fruta sin daño por frío (Tabla 5). La pérdida general de ácidos grasos saturados en las diferentes especies de los lípidos podría indicar cambios en su metabolismo, o un proceso de transición de fase de los lípidos de la membrana en una región específica de la membrana enriquecida por estos ácidos grasos.

El análisis total de ácidos grasos insaturados reveló que los frutos con severo daño por frío almacenados a 4 y 10 °C mostraron una reducción de 27%, 14% y 22%, respectivamente, comparado con frutos sin daño por frío. Los niveles de MGDG en ácidos grasos insaturados en frutos con severo daño por frío y almacenados a 10 °C fueron reducidos 75 y 56%, respectivamente, comparado con frutos sin daño (Tabla 5). En contraste, los frutos almacenados a 4 °C mostraron un incremento del 1% en los niveles de MGDG comparado con frutos sin daño. Sin embargo, el contenido de DGDG incrementó 9% en frutos almacenados a 10 °C y completamente perdido en frutos con severo daño por frío o almacenados a 4 °C. Los frutos con severo daño por frío mostraron una reducción en FI (70%) y CL (59%), y un incremento en FC (2%), FG (3%), FE(44%) y AF (10%) comparado con frutos sin daño. Mientras los frutos almacenados a 4 °C mostraron una reducción en FI (76%), FC (36%) y FE (39%), y un incremento en FG (66%), CL (65%) y AF (58%) comparado con frutos sin daño por frío. También los frutos almacenados a 10 °C mostraron una reducción en FI (69%), FC (26%), CL (70%), y un incremento en FG (9%) y FE (5%), comparado con frutos sin daño. En general, la relación de ácidos grasos insaturados y saturados fue de 1, 3, 5, y 3 en frutos sin daño por frío, severo daño por frío y almacenados a 4 °C y 10 °C, respectivamente; indicando una posible sustitución de ácidos grasos saturados por ácidos grasos insaturados como

respuesta al estrés por frío confirmando la idea de que a bajas temperaturas se inducen cambios metabólicos en los lípidos de la membrana y simultáneamente una transición de fase de los lípidos de la membrana propuesto en diferentes grupos de investigación (Lyons, 1973; Raison y Or, 1990). De acuerdo con estos autores, el presente estudio muestra que el almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas afecta el metabolismo de los lípidos en las membranas celulares (Figura 18), incluso la temperatura de 10 °C propuesta como la mejor temperatura de almacenamiento (Kader, 1999). Estos resultados remarcan la necesidad de nuevas estrategias de almacenamiento para reducir el daño por frío en frutas.

Los efectos de las bajas temperaturas en el metabolismo de los lípidos de la membrana también han sido reportados en otros modelos de frutas y plantas. Por ejemplo, ha sido sugerido que el daño por frío en tomate está asociado a la reducción en galactolípidos debido a los cambios de la biosíntesis de MGDG y DGDG (Nguyen y Mazliak, 1990; Yu y Willemont, 1996). De esta forma, nosotros hipotetizamos que las bajas temperaturas podrían inhibir las enzimas MGD y DGD sintasa causando una reducción en los niveles de MGDG y DGDG (Petroustos *et al.* 2014; Yuzawa *et al.* 2014). También ha sido sugerido que las rutas metabólicas de MGDG regulan los contenidos de ácidos grasos insaturados en galactolípidos durante la adaptación a bajas temperaturas (Yuzawa *et al.* 2014), indicando un importante rol del MGDG en el mecanismo del daño por frío.

En el presente estudio, también fue revelado que la fruta con daño por frío experimenta una reducción significativa en los niveles de AF y FG. Esta reducción podría estar causando disfunción mitocondrial debido a que el AF y FG son los principales precursores para la biosíntesis de CL, principal componente de la membrana mitocondrial (Acehan *et al.* 2011). También, la actividad de CL sintasa depende de la CL asociada a la membrana mitocondrial (Nowicki *et al.* 2005). Además, se ha mostrado que la CL es requerida para la producción de ATP mitocondrial (Lange *et al.* 2001; Ren *et al.* 2014), ensamblado y estabilidad de los súper complejos respiratorios (Mileykovskaya y Dowhan, 2014; Pineau *et al.* 2013; Schlame *et al.* 2000). Nuestros datos mostraron una fuerte pérdida de CL en frutos almacenados a bajas temperaturas indicando alteraciones en la funcionalidad de

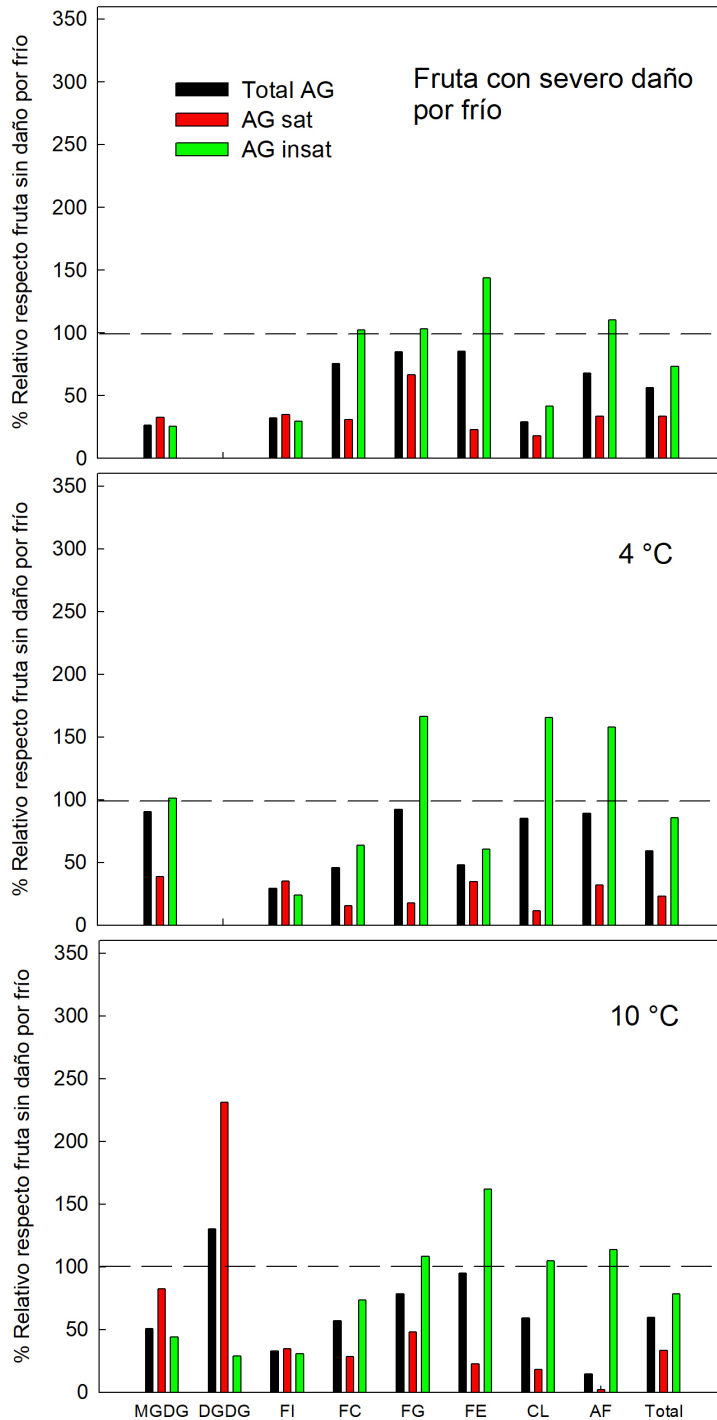
la membrana mitocondrial como fue indicado en papaya con daño por frío, la cual experimentó una reducción en la síntesis de ATP (Yong-Gui *et al.*, 2017).

Además, el bajo contenido de FI encontrado en frutos de guayaba con daño por frío (Tabla 5) podría tener un importante impacto en la funcionalidad de la membrana debido a que el inositol fosforilado está involucrado en la señalización celular (Boss y Im, 2012, Sharma y Kumar, 2015), tráfico de membrana y procesos de remodelación de fosfolípidos (Thole y Nielsen, 2008). Igualmente, los bajos niveles de fosfolípidos y galactolípidos podrían deberse al bajo contenido de AF observado en las membranas (Tabla 5) de los frutos con severo daño por frío (Dubots *et al.* 2010 y 2012). Así es posible que los bajos niveles de AF podrían estar involucrados en la incidencia del daño por las bajas temperaturas. Más estudios son necesarios para elucidar el rol de estos lípidos sobre el mecanismo de daño por las bajas temperaturas. Además, de encontrar una relación del cambio en el metabolismo y contenido de los lípidos anteriormente mencionados con el ablandamiento en los frutos de guayaba.

**Tabla 5.** Contenido de ácidos grasos ( $\text{ng g}^{-1}$  de membranas microsomales) en diferentes fosfolípidos (FL) y galactolípidos (GL) de frutos de guayaba sin daño por frío (sietes días a 20 °C), con severo daño por frío (4 semanas a 4 °C), y almacenados a 4 y 10 °C por 3 semanas.

| FL/GL                           | Total AG           | AG sat             | AG insat           | Total AG                               | AG sat            | AG insat           |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>Frutos sin daño por frío</b> |                    |                    |                    | <b>Frutos con severo daño por frío</b> |                   |                    |
| <b>MGDG</b>                     | 30.8 <sup>a</sup>  | 5.2 <sup>a</sup>   | 25.6 <sup>a</sup>  | 8.2 <sup>c</sup>                       | 1.7 <sup>c</sup>  | 6.5 <sup>c</sup>   |
| <b>DGDG</b>                     | 28.5 <sup>b</sup>  | 4.9 <sup>b</sup>   | 23.6 <sup>a</sup>  | -                                      | -                 | -                  |
| <b>FI</b>                       | 51.3 <sup>a</sup>  | 24.2 <sup>a</sup>  | 27.0 <sup>a</sup>  | 16.5 <sup>b</sup>                      | 8.4 <sup>b</sup>  | 8.0 <sup>b</sup>   |
| <b>FC</b>                       | 106.6 <sup>a</sup> | 39.7 <sup>a</sup>  | 66.9 <sup>a</sup>  | 80.7 <sup>b</sup>                      | 12.3 <sup>b</sup> | 68.4 <sup>a</sup>  |
| <b>FG</b>                       | 46.6 <sup>a</sup>  | 23.2 <sup>a</sup>  | 23.4 <sup>b</sup>  | 39.6 <sup>b</sup>                      | 15.4 <sup>b</sup> | 24.2 <sup>b</sup>  |
| <b>FE</b>                       | 36.2 <sup>a</sup>  | 17.5 <sup>a</sup>  | 18.7 <sup>c</sup>  | 30.9 <sup>b</sup>                      | 4.0 <sup>c</sup>  | 26.9 <sup>b</sup>  |
| <b>CL</b>                       | 44.3 <sup>a</sup>  | 23.2 <sup>a</sup>  | 21.1 <sup>b</sup>  | 13.0 <sup>c</sup>                      | 4.2 <sup>b</sup>  | 8.7 <sup>c</sup>   |
| <b>AF</b>                       | 50.1 <sup>a</sup>  | 27.5 <sup>a</sup>  | 22.6 <sup>b</sup>  | 34.1 <sup>c</sup>                      | 9.2 <sup>b</sup>  | 24.9 <sup>b</sup>  |
| <b>Total</b>                    | 394.2 <sup>a</sup> | 165.4 <sup>a</sup> | 228.8 <sup>a</sup> | 222.9 <sup>c</sup>                     | 55.2 <sup>b</sup> | 167.6 <sup>d</sup> |
| <b>4 °C</b>                     |                    |                    |                    | <b>10 °C</b>                           |                   |                    |
| <b>MGDG</b>                     | 27.9 <sup>b</sup>  | 2.0 <sup>c</sup>   | 25.9 <sup>a</sup>  | 15.6 <sup>c</sup>                      | 4.3 <sup>b</sup>  | 11.3 <sup>b</sup>  |
| <b>DGDG</b>                     | -                  | -                  | -                  | 37.1 <sup>a</sup>                      | 11.4 <sup>a</sup> | 25.7 <sup>a</sup>  |
| <b>FI</b>                       | 15.0 <sup>b</sup>  | 8.5 <sup>b</sup>   | 6.5 <sup>c</sup>   | 16.8 <sup>b</sup>                      | 8.4 <sup>b</sup>  | 8.3 <sup>b</sup>   |
| <b>FC</b>                       | 48.8 <sup>d</sup>  | 6.2 <sup>c</sup>   | 42.7 <sup>c</sup>  | 60.5 <sup>c</sup>                      | 11.4 <sup>b</sup> | 49.2 <sup>b</sup>  |
| <b>FG</b>                       | 43.1 <sup>b</sup>  | 4.1 <sup>c</sup>   | 38.9 <sup>a</sup>  | 36.5 <sup>b</sup>                      | 11.1 <sup>b</sup> | 25.4 <sup>b</sup>  |
| <b>FE</b>                       | 17.4 <sup>c</sup>  | 6.1 <sup>b</sup>   | 11.4 <sup>d</sup>  | 34.3 <sup>b</sup>                      | 4.0 <sup>c</sup>  | 30.4 <sup>a</sup>  |
| <b>CL</b>                       | 37.6 <sup>b</sup>  | 2.7 <sup>c</sup>   | 34.9 <sup>a</sup>  | 26.3 <sup>c</sup>                      | 4.2 <sup>c</sup>  | 22.1 <sup>b</sup>  |
| <b>AF</b>                       | 44.5 <sup>a</sup>  | 8.9 <sup>b</sup>   | 35.7 <sup>a</sup>  | 7.4 <sup>c</sup>                       | 0.6 <sup>c</sup>  | 6.8 <sup>c</sup>   |
| <b>Total</b>                    | 234.3 <sup>b</sup> | 38.4 <sup>c</sup>  | 195.9 <sup>b</sup> | 234.5 <sup>b</sup>                     | 55.4 <sup>b</sup> | 179.1 <sup>c</sup> |

<sup>a</sup> Valores con la misma letra minúscula en la misma fila y por cada tipo de ácido graso son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

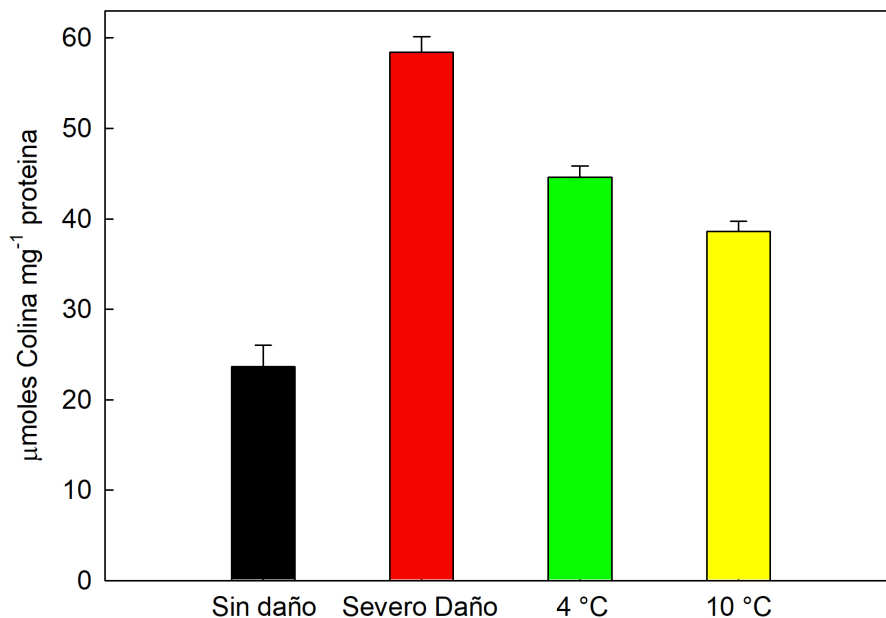


**Figura 18.** Porcentaje relativo de diferentes lípidos de membranas microsomales de frutos de guayaba con severo daño por frío, y almacenados 4 y 10 °C, respecto a frutos sin daño por frío. La línea colocada al 100 % significa el porcentaje relativo de la fruta sin daño por frío.



### 7.1.3 Actividad de fosfolipasa D

La actividad de la enzima fosfolipasa D fue evaluada para corroborar el efecto de la temperatura sobre el catabolismo de los lípidos de la membrana. Los frutos con severo daño por frío y almacenados a 4 y 10 °C presentaron mayor actividad de fosfolipasa D en comparación con los frutos sin daño por frío (58.44, 44.6, 38.6 y 23.7 mmoles de colina por mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figura 19). Estos resultados sugieren que el almacenamiento a bajas temperaturas induce un daño en la membrana, incluyendo la temperatura de 10 °C considerada como óptima. El incremento de la actividad de fosfolipasa D a bajas temperaturas ha sido reportado en pepino (Mao *et al.*, 2007), semillas de maíz (Pinhero *et al.*, 1998) y células de *Arabidopsis* (Ruelland *et al.*, 2002). Además, se ha reportado que la fosfolipasa D es la enzima que inicia el catabolismo de los lípidos, un proceso ligado a la maduración de los frutos (Pinhero *et al.* 2003; Jang *et al.*, 2012). De manera interesante, se ha propuesto que la actividad de fosfolipasa induce la biosíntesis de AF y la subsecuente síntesis de fosfolípidos y galactolípidos para mejorar la tolerancia a bajas temperaturas (Hong *et al.* 2016). Así es posible que los altos niveles de AF observados en este estudio podría representar una respuesta del mecanismo contra las bajas temperaturas. Sin embargo, también podría estar indicando una alteración del metabolismo de los lípidos de la membrana. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio nos podrían indicar que aún en la temperatura óptima de almacenamiento la estabilidad e integridad de la membrana celular se ve afectada, por lo tanto es importante tener en cuenta estos efectos para poder establecer una relación entre la pérdida de integridad de la membrana celular y el mecanismo de ablandamiento de los frutos de guayaba.



**Figura 19.** Actividad de fosfolipasa D en frutos sin daño por frío, frutos con severo daño por frío y almacenados a 4 y 10 °C.

#### 7.1.4 Calidad visual

La figura 20 muestra el efecto de las temperaturas de almacenamiento sobre los frutos de guayaba 'Media China', después de ser transferidos a temperatura ambiente. Los frutos almacenados 4 semanas a 4 °C resultaron con severo daño por frío; presentaron incapacidad para madurar, obscurecimiento en la piel y un ablandamiento acelerado (datos no mostrados), similar a lo observado en los frutos almacenados 3 semanas a 4 °C. Mientras que los frutos almacenados a 10 °C mantuvieron mayor firmeza (datos no mostrados) y presentaron una apariencia externa aceptable, muy similar a los frutos almacenados 7 días a 20 °C (frutos sin daño por frío) (Figura 20). Estos resultados indican que las bajas temperaturas están provocando un daño fisiológico sobre la membrana celular de los frutos. Un comportamiento similar ha sido observado en frutos de durazno cv. 'Beijing 33' con daño por frío, donde se observó obscurecimiento en la piel y un ablandamiento acelerado (Changfeng y Shiping, 2009). Por su parte, frutos de piña cv. 'Trad-See-

Thong' con daño por frío, presentaron los daños principalmente en la pulpa como pardeamiento y tejido traslucido (Om-arun *et al.*, 2015).

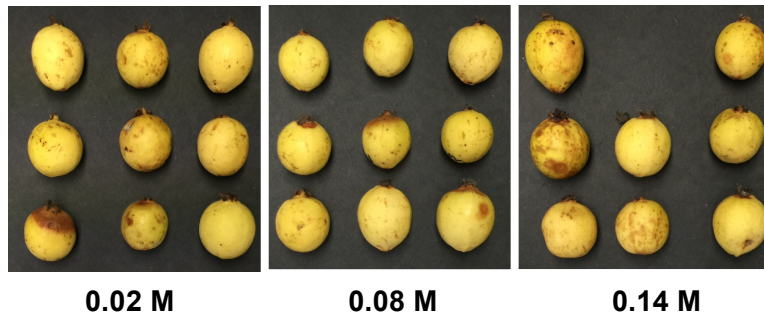


**Figura 20.** Apariencia externa de frutos de guayaba almacenados tres semanas a 4 °C (A) y 10 °C (B), y cuatro semanas a 4 °C más 3 días a 20 °C (C).

## **7.2 Efecto de la aplicación en poscosecha de calcio quelado con glicina (Metalosate Ca) en la resistencia mecánica del fruto.**

### **7.2.1 Efectos en la calidad visual**

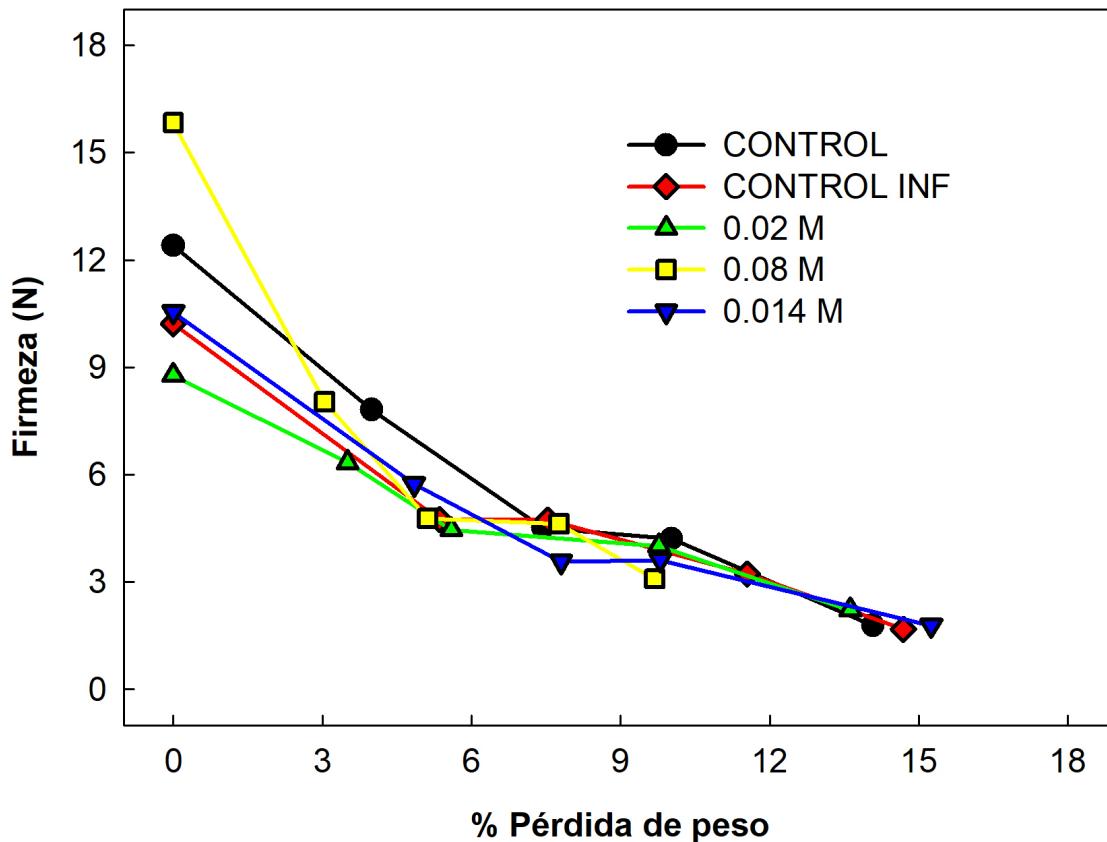
La calidad visual de los frutos tratados con 0.08 M de glicina Ca mostraron la mejor calidad visual, mientras que los otros tratamientos presentaron un mayor deterioro y marchitez (Figura 21). La mejor calidad visual observada en el tratamiento con 0.08 M podría deberse a diferentes factores en los que interviene el calcio en la fisiología de la fruta (Aghdam *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha observado en duraznos de la variedad 'Andros' que concentraciones mayores de 6% de  $\text{CaCl}_2$ , lactato de calcio y propionato de calcio pueden ser perjudiciales para la fruta debido a que se originan daños en la piel, incrementa el ablandamiento y se facilita el ataque de hongos (Manganaris *et al.*, 2007).



**Figura 21.** Calidad visual de frutos de guayaba tratados con glicina-calcio almacenados 20 días a 10 °C.

### 7.2.2 Cambios en la pérdida de peso y su relación con la firmeza del fruto

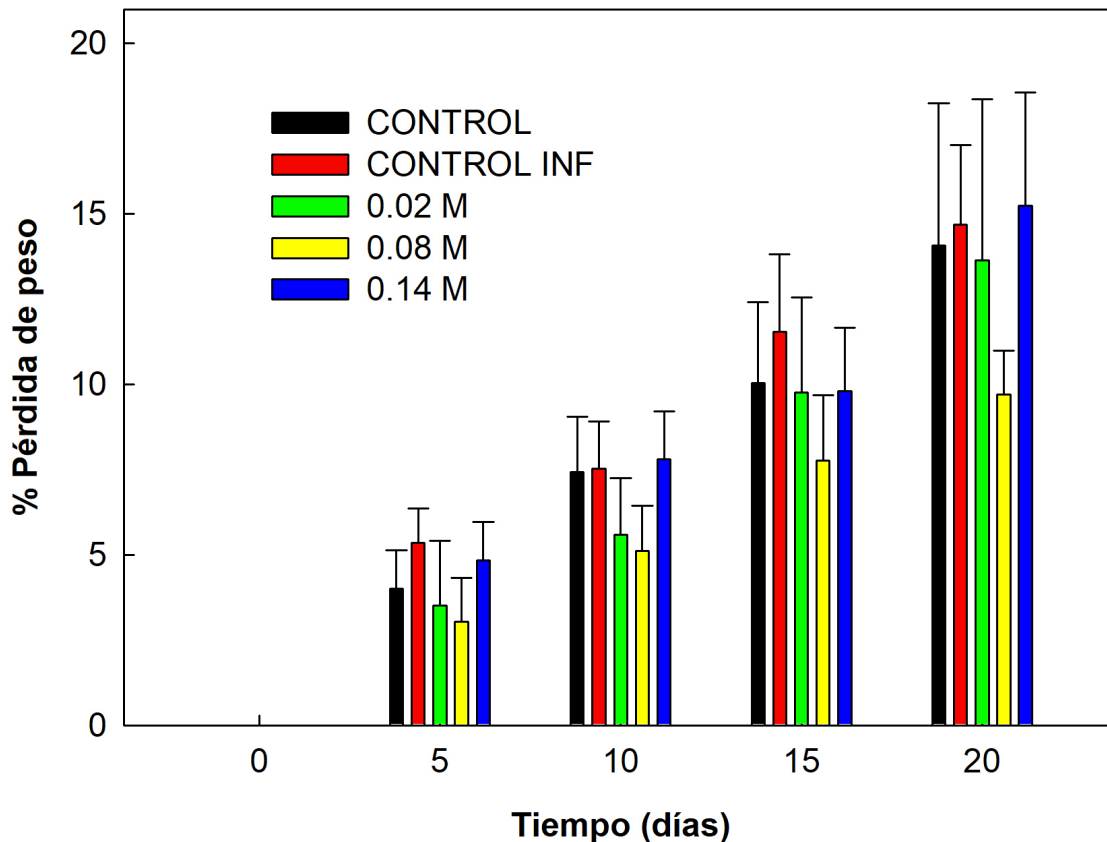
La pérdida de firmeza en frutos se ha relacionado principalmente con la degradación de la pared celular por enzimas hidrolíticas como la poligalacturonasa (PG); no obstante, se ha reportado en tomate transgénico que la supresión del gen que codifica para la enzima PG, tuvo efecto mínimo en el ablandamiento o textura de los frutos (Brummell y Harpster, 2001; Rose *et al.*, 2003). Mientras que al comparar la pérdida de peso, firmeza y turgencia celular durante la maduración de los mismos frutos se observó una relación directa entre estos parámetros. Estos autores concluyeron que la pérdida de turgencia está relacionada con la pérdida de agua por transpiración y que es otro factor importante que influye sobre el ablandamiento (Saladié *et al.*, 2007). En este estudio se observó un comportamiento similar ya que en los frutos de guayaba con una pérdida de peso de hasta el 6%, la firmeza disminuye drásticamente conforme se incrementa la pérdida de peso y este efecto fue menor con mayores pérdidas de peso (Figura 22). Estos datos señalan que la pérdida de agua, en las primeras etapas de almacenamiento, es un factor determinante de la pérdida firmeza de estos frutos.



**Figura 22.** Relación entre la firmeza y la pérdida de peso de frutos tratados con glicina-calcio almacenados 20 días a 10 °C.

Considerando de manera separada los efectos de los tratamientos en la pérdida de peso; este se incrementó gradualmente durante los 20 días de almacenamiento en todos los tratamientos (Figura 23), siendo los frutos tratados con 0.08M de glicina-calcio, los que presentaron la menor pérdida de peso (9.7%), mientras que los frutos tratados con 0.02M y 0.14M de glicina-calcio, y los frutos control presentaron los valores más altos (14.4%). Un comportamiento similar fue observado por Mahajan *et al.* (2011) en guayaba cv. 'Allahabad Safeda', quienes indicaron que frutos tratados con 2% de  $\text{CaCl}_2$  presentaron una menor pérdida de peso. Gopi y Hari (2002), trabajando con la misma variedad, compararon diferentes sales de calcio observando que los frutos tratados con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  presentaron menor pérdida de peso respecto de frutos tratados con  $\text{CaCl}_2$ . Un

comportamiento diferente fue observado en mango tratado con diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ , donde se observó que a mayor concentración de calcio los frutos perdían menos peso (Galvis *et al.*, 2003). También Kitemann *et al.*, (2010) infiltrando manzanas con una solución 150 mM de  $\text{CaCl}_2$  por 10 min, redujeron la producción de etileno y la tasa de respiración pero mantuvieron una mejor firmeza, aunque las enzimas de degradación de pared celular incrementaron su actividad. La menor pérdida de peso observada en los frutos tratados con 0.08M glicina-calcio podría deberse a que el calcio puede retrasar la velocidad de respiración y disminuir la pérdida de agua por transpiración, lo cual ayudaría a que los frutos de guayaba mantuvieran una mejor apariencia, elasticidad, crugencia o turgencia haciendo al producto con mejores características sensoriales. Es posible que al haber una menor tasa de respiración ocurra una menor tasa de pérdida de agua y por ello una mejor vida poscosecha del producto (Crisosto y Mitchell, 2007).

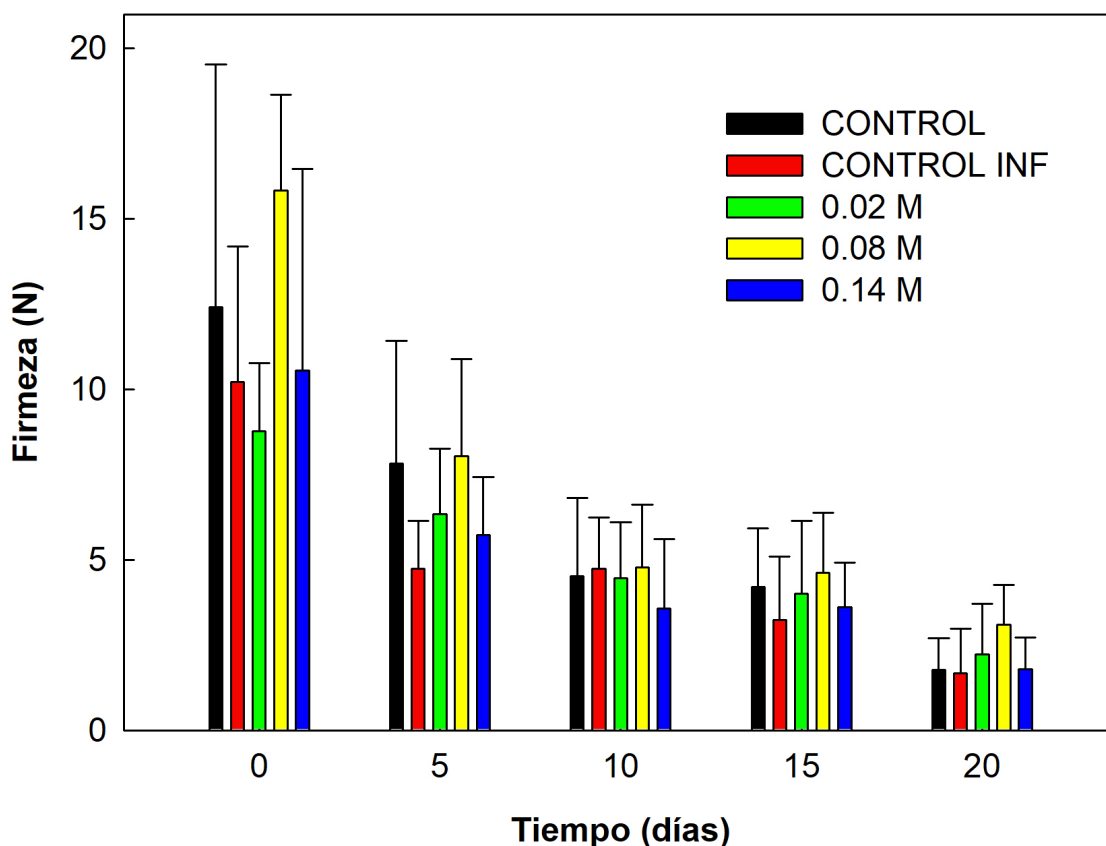


**Figura 23.** Cambios en la pérdida de peso de frutos de guayaba tratados con glicina-calcio almacenados 20 días a 10 °C.

### 7.2.3 Cambios en la firmeza

La firmeza de la fruta disminuyó a lo largo del almacenamiento (Figura 24). Al final del mismo, los frutos tratados con 0.08M de glicina-calcio presentaron la mejor firmeza (3.1N), seguida por los frutos con 0.02M (2.2N), mientras que el tratamiento con 0.14M, el tratamiento control y control infiltración presentaron en promedio la mayor pérdida de firmeza durante el almacenamiento (1.75N); no obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los tratamientos. Por su parte, Mahajan *et al.* (2011), observaron una mayor firmeza en frutos de guayaba de la variedad 'Allahabad Safeda' tratados con  $\text{CaCl}_2$ , en comparación con el tratamiento control. Otros investigadores han reportado un

efecto benéfico de las aplicaciones de  $\text{CaCl}_2$  en la firmeza de mango y durazno (Galvis *et al.*, 2003). Aunque no se observaron diferencias estadísticas, la mejor calidad observada en los frutos tratados con 0.08M de glicina-calcio, podría indicar que este compuesto tiene otros efectos adicionales al fortalecimiento de la pared celular (Lionetti *et al.*, 2010) que afectan la pérdida de peso y la fisiología poscosecha de los frutos (Conway *et al.*, 1995; Mahajan y Dhatt, 2004).



**Figura 24.** Cambios en la firmeza de frutos de guayaba tratados con diferentes concentraciones de glicina-calcio almacenados 20 días a 10 °C.

#### 7.2.4 Contenido de sólidos solubles totales (SST) y acidez titulable (AT)

Durante el almacenamiento el contenido de sólidos solubles totales incrementó en todos los frutos tratados en un rango de 6.7 a 9.0 °Brix, así mismo en la acidez titulable se observa un ligero incremento en un rango de 0.5 a 1.6 g de ácido



cítrico  $100 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco, no presentando diferencias significativas entre los tratamientos. Este mismo comportamiento lo observó Mercado-Silva *et al.*, (1998) en frutos de guayaba de la variedad 'Media China' de la temporada primavera-verano, mientras que en los frutos de la temporada otoño-invierno, la acidez titulable fue mayor y se mantuvo durante las diferentes etapas de maduración. El incremento observado en el contenido de sólidos solubles totales es característico de un fruto climatérico y podría deberse a la hidrólisis del almidón en azúcares simples (Singh *et al.*, 2014). Estos datos señalaron que la maduración no fue afectada por la aplicación de los tratamientos poscosecha.

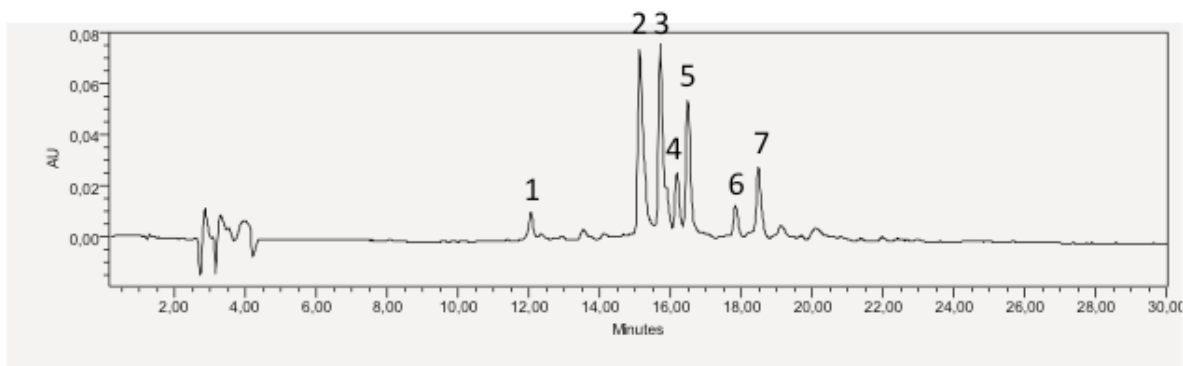
### **7.2.5 Contenido total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante**

El contenido total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se analizó durante los 15 días de almacenamiento a  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Durante este periodo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de calcio aplicado. No obstante, los valores registrados en el contenido de compuestos fenólicos variaron en un rango de 279 a  $304 \text{ mg EQAG } 100 \text{ g}^{-1}$ , similar a lo reportado por Zapata *et al.* (2013), en frutos de guayaba de la variedad 'Agrida' donde el contenido de compuestos fenólicos presentó valores de  $385 \text{ mg EQAG } 100 \text{ g}^{-1}$ . Mientras que la capacidad antioxidante registró valores altos durante el almacenamiento en un rango de 3104 a  $3575 \text{ } \mu\text{mol EQTrolox } 100 \text{ g}^{-1}$ . Por su parte, Zapata *et al.* (2013) en frutos de guayaba de la variedad 'Agrida' reportaron valores más bajos ( $1177 \text{ } \mu\text{mol EQTrolox } 100 \text{ g}^{-1}$ ).

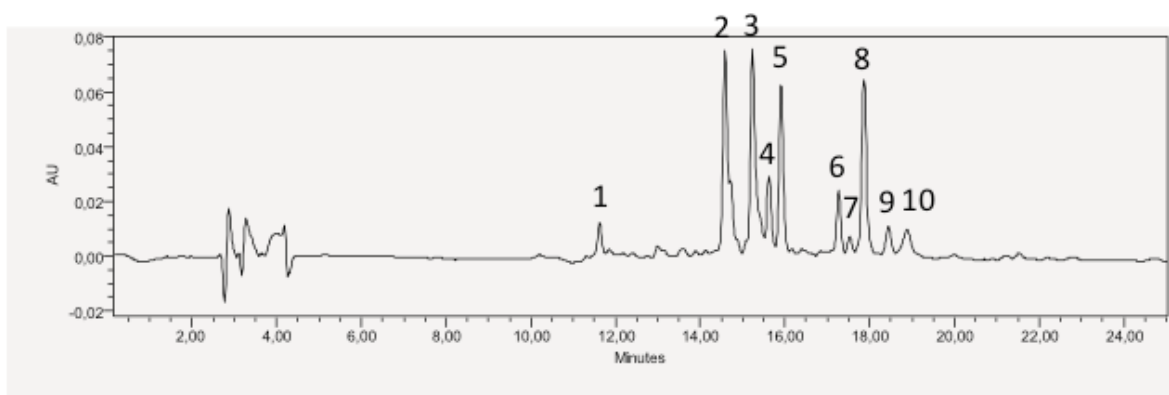
### **7.2.6 Cambios en el perfil de compuestos fenólicos por HPLC**

El perfil de compuestos fenólicos por HPLC se registró durante 15 días de almacenamiento a  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . La Figura 25 muestra el perfil de los extractos metanólicos de los frutos de guayaba al inicio del almacenamiento. La técnica cromatográfica aplicada permitió separar 7 compuestos que no se identificaron por falta de estándares; no obstante, fue posible observar que dicho perfil cambio

durante el almacenamiento (Figura 26). A partir de los cinco días y hasta el final del almacenamiento el número de compuestos fenólicos separados se elevó a 10 fracciones. Estos resultados sugieren que durante la maduración de los frutos hay una síntesis de nuevos fenoles aunque los cambios para cada uno de las fracción fueron diferentes y parecieron estar influidos por los tratamientos de calcio aplicado.



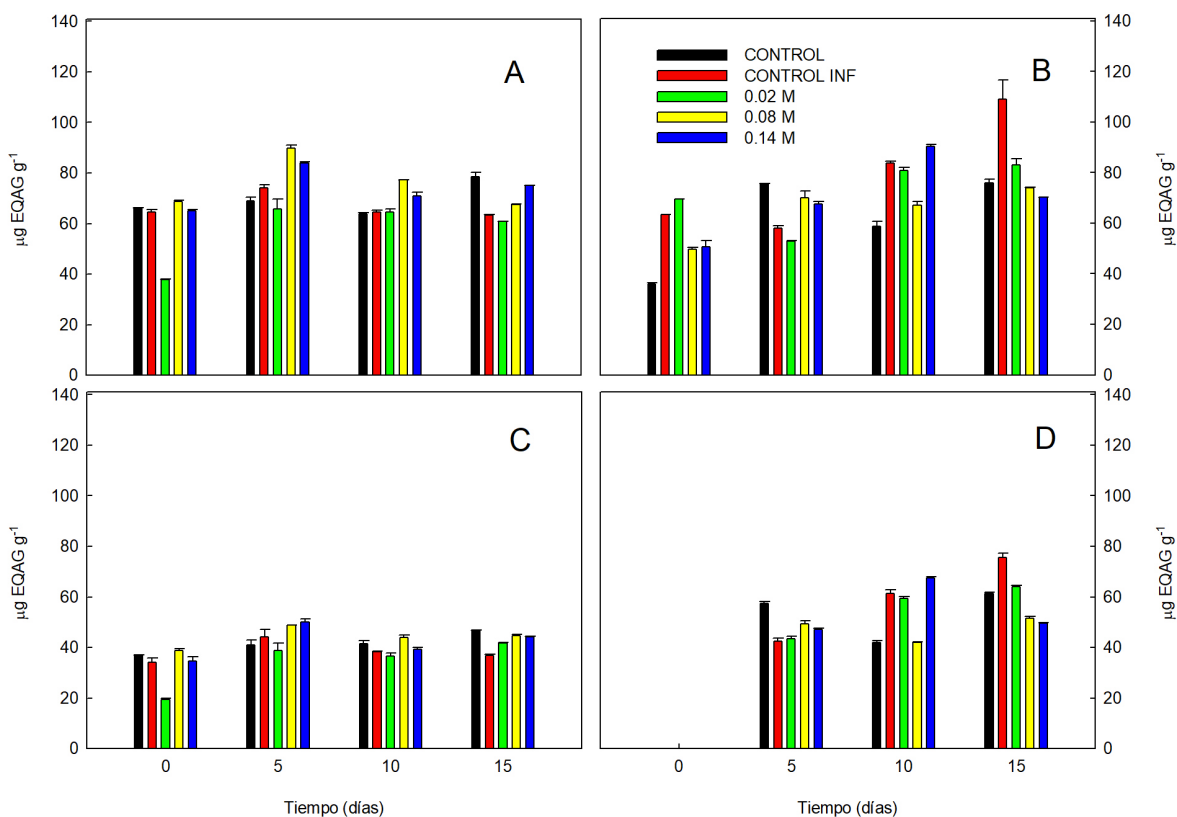
**Figura 25.** Cromatograma de fracciones de compuestos fenólicos de frutos de guayaba tratados con quelato de calcio al inicio del almacenamiento.



**Figura 26.** Cromatograma de fracciones de compuestos fenólicos de frutos de guayaba tratados con quelato de calcio a partir de cinco días de almacenamiento.

Durante el almacenamiento, las mayores concentraciones fueron observadas en las fracciones 2, 3, 5 y 8. En la fracción 2, se observó un incremento en los frutos tratados con 0.02 y 0.14 M de quelato de calcio y los frutos control, siendo los frutos tratados con 0.14 M los que presentaron la mayor concentración (75.09  $\mu\text{g EQAG/g}$ ); mientras que los frutos tratados con 0.08 M de quelato de calcio y los frutos control infiltrados con agua no mostraron cambios (Figura 27 A). Por otro

lado, la fracción 3 incrementó sus contenidos en todos los tratamientos, siendo el tratamiento control infiltrado con agua el que presentó la mayor concentración (109.03  $\mu\text{g EQAG/g}$ ) (Figura 27 B). La fracción 5, también incrementó su contenido durante almacenamiento en todos los tratamientos, aunque el tratamiento control fue el que presentó la mayor concentración (46.75  $\mu\text{g EQAG/g}$ ) (Figura 27 C). La fracción 8, no se observó al inicio del almacenamiento en ninguno de los tratamientos, y registrando su presencia en el día cinco de almacenamiento e incrementando hasta el final del almacenamiento, siendo el tratamiento control infiltrado con agua el que presentó la mayor concentración (75.48  $\mu\text{g EQAG/g}$ ) (Figura 27 D).



**Figura 27.** Cambios en la concentración de las fracciones 2 (A), 3 (B), 5 (C) y 8 (D) de compuestos fenólicos en frutos de guayaba almacenados 15 días a 10 °C.

Los resultados indicaron que durante la maduración de los frutos de guayaba hubo síntesis de nuevos compuestos fenólicos y otros, ya presentes, aumentaron su contenido durante el almacenamiento. Los tratamientos de calcio parecieron

solo promover el incremento del compuesto de la fracción 2 mientras que en las otras fracciones estos tratamientos parecieron retrasar o disminuir su síntesis.

Estos resultados podrían indicar que el calcio tiene efectos diferenciales en la síntesis de fenoles en algunos casos activando y en otros no tuvo efecto o la redujo. Por ello es posible que también la actividad de la fenilalanina amonioliasa (PAL) pudo ser afectada diferencialmente llevando a los cambios observados. No obstante, estos cambios tampoco parecen señalar un efecto en la firmeza de los frutos aunque en otros reportes se ha señalado que los flavonoides como la catequina, epicatequina, epigallocatequina y epigallocatequina-3-galato al interaccionar con la membrana podrían mejorar el ordenamiento de los lípidos y así proteger la membrana celular (Abram *et al.*, 2013) y probablemente ayudando a mantener la firmeza.

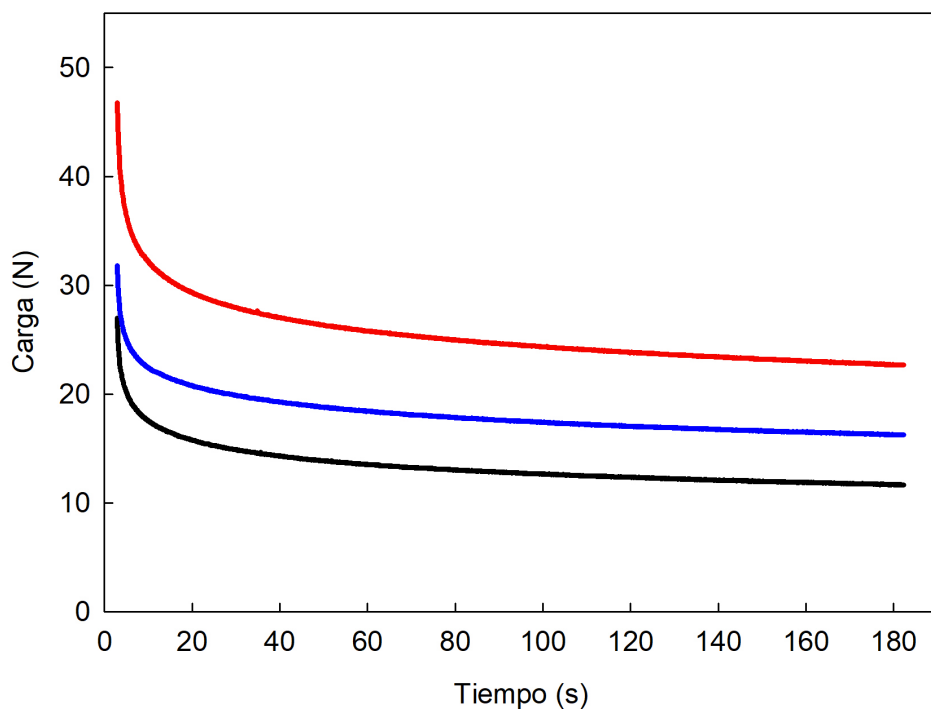
#### **7.2.7 Fuga de electrolitos**

El porcentaje de fuga de electrolitos no presentó cambios durante el almacenamiento, ni se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, los valores registrados variaron dentro de valores bajos (11-21%) indicando que la permeabilidad de las membranas pareciera no estar muy alterada y es posible que los efectos de las infiltraciones en la calidad de los frutos se deba a otros factores que implican al Ca en la fisiología del fruto. Mientras en que otros frutos como melón, kiwi y litchi el porcentaje de fuga de electrolitos varía dentro de valores más altos (10-100%), presentando alteraciones fuertes en la permeabilidad e integridad de la membrana celular (Antunes y Sfakiotakis, 2008; Lacan y Baccou, 1996; Yi *et al.*, 2008).

### **7.3 Descripción biomecánica de la guayaba en diferente estado de madurez sometido a relajación.**

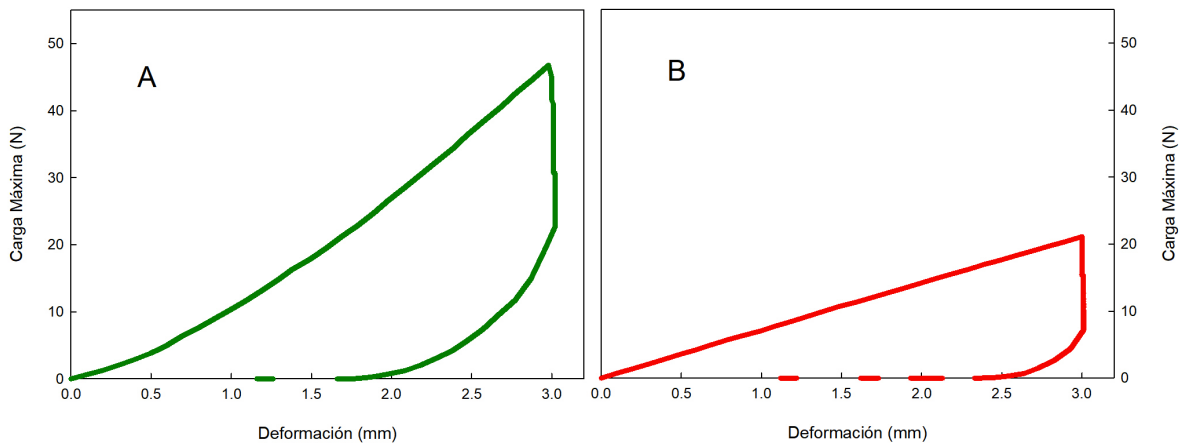
De manera tradicional en tecnología poscosecha, la evaluación de firmeza de frutos se realiza mediante pruebas de penetración o compresión (Bourne, 1966; Costell *et al.*, 1997). No obstante, estas determinaciones no proporcionan una evaluación dinámica de la resistencia mecánica del proceso de ablandamiento ya que este está influido por el estado de madurez, la pérdida de agua (como se indicó anteriormente) y del mismo proceso de maduración que incluye degradación de la pared celular, hidrólisis de carbohidratos entre otros, los cuales no pueden ser evaluados por una prueba simple de compresión o penetración.

Se partió del concepto que los frutos responden diferencialmente cuando son sometidos a una carga o una deformación constantes de compresión, es decir no son completamente elásticos (como un sólido que responde a la ley de Hooke) ni son completamente líquidos y por tanto no son líquidos Newtonianos; además la relación esfuerzo deformación depende de la velocidad con la que se aplique dicha deformación y del tiempo de aplicación. Por ello fue importante identificar otra metodología que permitiera generar parámetros biomecánicos relacionados a la resistencia del fruto que describiera la deformación registrada cuando son sometidos a una fuerza de compresión uniaxial ejercida durante un tiempo constante. Estos estudios corresponden a las pruebas de relajación, las cuales nos muestran como responde un material cuando es sometido a un esfuerzo o deformación constante durante un tiempo establecido. La Figura 28 muestra el esfuerzo de relajación de diferentes frutos de guayaba durante el desarrollo de la prueba hasta alcanzar 3 mm de deformación y mantenida durante 180 segundos (3 min). Claramente se observa que los frutos de guayaba son materiales viscoelásticos y que la respuesta mecánica relajación es parecida. Esta prueba se realizó con frutos verde amarillos (aparentemente de un mismo estado de madurez); no obstante, se observa que la carga máxima para alcanzar la deformación establecida fue diferente lo que permite establecer en el mismo color del fruto que estos se encuentren en distinto estado de madurez.



**Figura 28.** Curvas de esfuerzo de relajación de frutos de guayaba del mismo estado de madurez sometidos a una deformación de 3 mm durante 180 segundos.

La prueba de relajación refleja de manera más aproximada el comportamiento mecánico del fruto en un sistema de manejo poscosecha real cuando es sometido a esfuerzos de compresión en su cadena de manejo. Las características geométricas del fruto así como su conformación estructural de baya son factores que afectan su resistencia a la compresión. Estos mismos reogramas pueden ser representados mediante las variables de carga vs deformación; bajo condiciones geométricas similares, los frutos de guayaba verde maduro sometidos a una deformación de 3 mm durante 3 minutos, mostraron un reograma con una carga máxima mayor respecto de un fruto en estado amarillo firme (Figuras 29 A y B). Para un sólido elástico; una vez liberada la carga, la deformación alcanzada durante la compresión este debe regresar al punto inicial. Los frutos de guayaba en ambos estados de madurez, no regresaron al punto inicial y quedando una deformación no recuperable después de la prueba lo cual demostró su comportamiento viscoelástico.



**Figura 29.** Reogramas obtenidos de pruebas de relajación en frutos de guayaba verde-maduro (A) y amarillo maduro (B).

El comportamiento viscoelástico de los frutos puede ser analizado a través de diferentes modelos matemáticos. El modelo de Maxwell asume que el sólido está conformado por una fracción sólida, que aporta los elementos de elasticidad, y una fracción líquida que aporta los elementos de un fluido viscoso y puede ser representado mediante la siguiente ecuación (Mohsenin, 1970):

$$\sigma(t) = \sigma_d e^{-\frac{t}{T_{rel}}} + \sigma_e$$

Donde  $\sigma(t)$  significa el esfuerzo a cualquier tiempo “t”,  $\sigma_d$  la caída del esfuerzo o esfuerzo de relajación y  $\sigma_e$  el esfuerzo de equilibrio o la resistencia del fruto después de un tiempo infinito de aplicación de la deformación establecida. No obstante, para materiales que son sujetos a un esfuerzo constante, este modelo solo representa el comportamiento de un fluido Newtoniano pero no representa la deformación elástica retardada que muestra el material con el tiempo. Por ello se ha desarrollado otro modelo llamado modelo de Maxwell generalizado (Mohsenin, 1970).

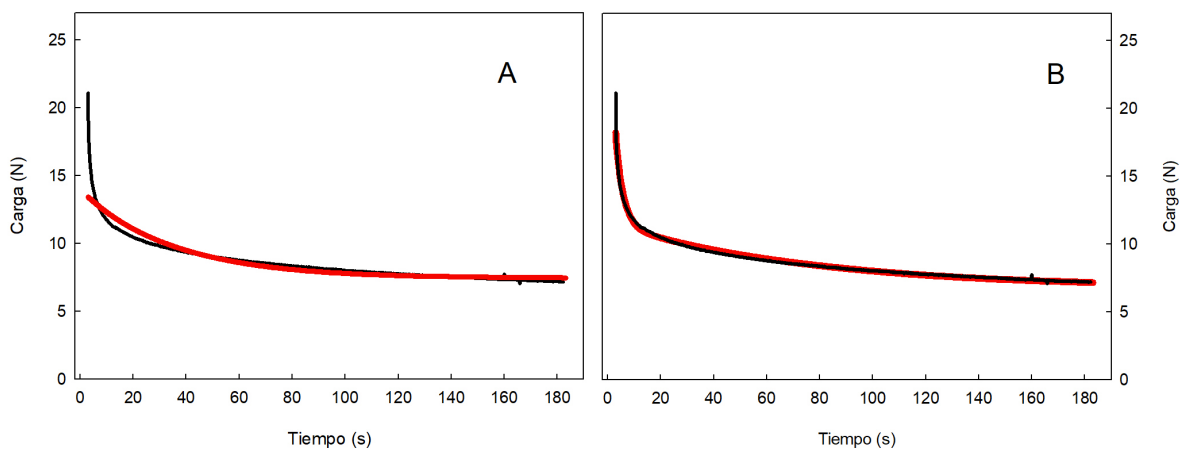
El modelo de Maxwell Generalizado es comúnmente utilizado para representar el esfuerzo de relajación. Si este modelo está sujeto a una deformación constante  $\epsilon_0$  a tiempo  $t=0$ , el esfuerzo total en el modelo decrece con el tiempo y puede ser

representado por el Modelo general con n elementos. Considerando solamente dos elementos de Maxwell se obtiene la siguiente ecuación (Mohsenin, 1970):

$$\sigma(t) = \varepsilon_0(E_{d1}e^{-\frac{t}{T_1}} + E_{d2}e^{-\frac{t}{T_2}} + E_e)$$

Donde  $T_1$ , y  $T_2$ , son los tiempos de relajación ( $T_{rel}$ ), correspondientes a dos elementos del modelo de Maxwell. El tiempo de relajación es el tiempo requerido para que el esfuerzo caiga  $1/e$  veces o 36.8 % de su valor original, esto es, a una deformación constante un elemento de Maxwell relaja su estrés exponencialmente a una velocidad determinada por el  $T_{rel}$  (Mohsenin, 1970).

Con los datos obtenidos de las determinaciones realizadas, se aplicaron los dos modelos para establecer el grado de ajuste de ambos modelos con los datos experimentales. Utilizando el paquete estadístico JMP V8, se llevo a cabo una regresión no lineal utilizando las ecuaciones propuestas. El modelo de Maxwell Generalizado fue el que mejor ajustó los datos obtenidos de la prueba de esfuerzo-relajación (Figura 30 A y B), demostrando que este modelo explica mejor el comportamiento viscoelástico de los frutos cuando son sometidos a esfuerzos o deformaciones constantes.



**Figura 30.** Modelo de Maxwell (A) y Maxwell Generalizado (B) aplicados para describir el comportamiento viscoelástico de frutos de guayaba. Línea roja indica el ajuste del modelo a los datos de la prueba de esfuerzo-relajación.



A través de las regresiones no lineales se obtuvieron las constantes de elasticidad del modelo así como los tiempos de relajación en los frutos verde maduro y amarillo maduro. No se observaron diferencias estadísticas significativas en la constante de elasticidad inicial y las elasticidades de cada elemento del modelo; mientras que la constante de tiempo de relajación de los dos elementos de Maxwell (T1 y T2) mostraron diferencias significativas asociadas al estado de madurez, el estado de madurez amarillo maduro presentó los menores valores respecto de los frutos verde amarillos (Tabla 6). Esto indicó que los frutos maduros presentan su punto de inflexión mas pronto que los frutos verde amarillos. Estos resultados sugieren que conforme avanza la maduración de los frutos su comportamiento es más similar a un líquido que a un sólido, indicando que los frutos son más viscosos y en consecuencia menos firmes. Estos resultados señalan que el Modelo de Maxwell Generalizado de dos elementos explica el comportamiento mecánico de los fruto de guayaba cuando son sometidos a esfuerzos constantes de deformación. Un comportamiento similar fue observado por Kanjuna *et al.* (1998) en plátanos 'Musa AAA', quienes indicaron que frutos más maduros presentaron menor valor en las constantes de tiempo de relajación y una menor firmeza.

**Tabla 6.** Cambios en las constantes del Modelo de Maxwell Generalizado de frutos de guayaba 'Media China' en dos estados de madurez.

| <b>Estado<br/>Madurez</b> | $\epsilon_0$     | $E_{d1}$          | $T_1$              | $E_{d2}$          | $T_2$            | $E_e$             |
|---------------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Verde                     | 1.4 <sup>a</sup> | 21.7 <sup>a</sup> | 109.6 <sup>a</sup> | 50.5 <sup>a</sup> | 4.7 <sup>a</sup> | 41.1 <sup>a</sup> |
| Amarillo                  | 0.7 <sup>a</sup> | 17.0 <sup>a</sup> | 73.5 <sup>b</sup>  | 64.6 <sup>a</sup> | 3.2 <sup>b</sup> | 23.0 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ ).

El modelo anterior representó adecuadamente el comportamiento mecánico de los frutos en distintos estados de madurez. No obstante, es necesario también investigar si con los reogramas obtenidos de la prueba de relajación es posible obtener un parámetro estimador de los cambios en la resistencia del fruto cuando sea sometidos a diferentes tratamientos. Siguiendo la metodología descrita en la

sección 6.5.2.2, se obtuvieron los parámetros biomecánicos de carga máxima (CM); deformación recuperable (DR); deformación no recuperable (DNR); trabajo de compresión (TC); trabajo de descompresión (TDC) y energía absorbida (EA). De cada fruto analizado, también se obtuvieron el diámetro máximo de los frutos (D), el espesor del pericarpio (EP); el diámetro de la cavidad de las semillas (CV). Con el contenido de AT y SST y CM se obtuvo el índice de maduración (RPI). Con excepción de los SST y la AT, los demás factores disminuyeron conforme avanzó la maduración (Tabla 7). Estos resultados son lógicos ya que a medida que se madura el fruto, disminuyen sus dimensiones geométricas y la resistencia mecánica.

La deformación no recuperable (DNR) incrementó a medida que avanzó la maduración. El comportamiento del RPI durante la maduración es lógico puesto que en su expresión se incluye la CM que es mayor en estado verde maduro; al igual que los valores de acidez, aunque los valores de SST fueron menores. Si la DNR es menor en estado verde maduro (el fruto es más elástico) y se incrementa con la maduración se hace más viscoelástico e incrementa su deformación (Tabla 7).

**Tabla 7.** Cambios de las propiedades fisicoquímicas y biomecánicas de frutos de guayaba 'Media China' en dos estados de madurez.

| <b>Estado Madurez</b> | <b>SST</b>        | <b>AT</b>         | <b>CM</b>         | <b>DR</b>         | <b>DNR</b>       | <b>EA</b>         | <b>RPI</b>       | <b>D</b>          | <b>EP</b>         | <b>CV</b>         |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Verde                 | 10.1 <sup>a</sup> | 0.70 <sup>a</sup> | 32.8 <sup>a</sup> | 0.99 <sup>a</sup> | 2.0 <sup>b</sup> | 37.7 <sup>a</sup> | 5.4 <sup>a</sup> | 57.6 <sup>a</sup> | 15.2 <sup>a</sup> | 42.5 <sup>a</sup> |
| Amarillo              | 9.4 <sup>a</sup>  | 0.66 <sup>a</sup> | 17.6 <sup>b</sup> | 0.49 <sup>b</sup> | 2.5 <sup>a</sup> | 24.7 <sup>b</sup> | 4.7 <sup>b</sup> | 52.5 <sup>b</sup> | 12.7 <sup>b</sup> | 39.9 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup>Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ ). Sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT), carga máxima (CM), deformación recuperable (DR), deformación no recuperable (DNR), energía absorbida (EA), índice de madurez (RPI), diámetro del fruto (D), espesor del epicarpio (EP) y cavidad de alojamiento de las semillas (CV).

La identificación de los mejores parámetros que expliquen el comportamiento biomecánico de los frutos se enfocó a través de un análisis multivariado que permite señalar el grado de interacción entre las diferentes variables analizadas.

La Tabla 8 muestra los coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros biomecánicos, el RPI y aquellos que definen la geometría del fruto. El

diámetro de fruto, el espesor del pericarpio, la dimensión de la cavidad de las semillas así como el contenido de sólidos solubles totales y la acidez no mostraron una interacción significativa. Por otro lado la DNR mostró coeficientes de correlación negativos altamente significativos con la DR, el TC, TDC, la EA, CM y el RPI. Tomando estos datos en su conjunto parece indicar que la DNR pudiera ser un factor a utilizar como el indicador de la resistencia mecánica de este fruto.

**Tabla 8.** Coeficientes de correlación entre los parámetros biomecánicos, de madurez y geometría del fruto de guayaba.

|     | CM    | DR    | DNR   | TC    | TDC   | EA    | SST   | AT    | RPI   | D     | EP    | CV    |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CM  | 1.00  | 0.81  | -0.81 | 1.00  | 0.94  | 0.97  | -0.16 | 0.38  | 0.81  | 0.46  | 0.21  | 0.37  |
| DR  | 0.81  | 1.00  | -1.00 | 0.81  | 0.78  | 0.78  | -0.27 | 0.45  | 0.77  | 0.55  | 0.11  | 0.57  |
| DNR | -0.81 | -1.00 | 1.00  | -0.81 | -0.78 | -0.78 | 0.27  | -0.45 | -0.77 | -0.55 | -0.11 | -0.57 |
| TC  | 1.00  | 0.81  | -0.81 | 1.00  | 0.93  | 0.98  | -0.15 | 0.39  | 0.81  | 0.45  | 0.20  | 0.36  |
| TDC | 0.94  | 0.78  | -0.78 | 0.93  | 1.00  | 0.84  | -0.14 | 0.29  | 0.70  | 0.44  | 0.17  | 0.38  |
| EA  | 0.97  | 0.78  | -0.78 | 0.98  | 0.84  | 1.00  | -0.14 | 0.42  | 0.83  | 0.42  | 0.20  | 0.33  |
| SST | -0.16 | -0.27 | 0.27  | -0.15 | -0.14 | -0.14 | 1.00  | -0.37 | -0.62 | 0.17  | 0.23  | 0.00  |
| AT  | 0.38  | 0.45  | -0.45 | 0.39  | 0.29  | 0.42  | -0.37 | 1.00  | 0.65  | 0.04  | -0.26 | 0.28  |
| RPI | 0.81  | 0.77  | -0.77 | 0.81  | 0.70  | 0.83  | -0.62 | 0.65  | 1.00  | 0.25  | 0.03  | 0.28  |
| D   | 0.46  | 0.55  | -0.55 | 0.45  | 0.44  | 0.42  | 0.17  | 0.04  | 0.25  | 1.00  | 0.60  | 0.67  |
| EP  | 0.21  | 0.11  | -0.11 | 0.20  | 0.17  | 0.20  | 0.23  | -0.26 | 0.03  | 0.60  | 1.00  | -0.19 |
| CV  | 0.37  | 0.57  | -0.57 | 0.36  | 0.38  | 0.33  | 0.00  | 0.28  | 0.28  | 0.67  | -0.19 | 1.00  |

El análisis multivariado por estados de madurez permitió identificar que las interacciones cambian con el estado de madurez (Tablas 9 y 10). En estado verde maduro, las relaciones de la DNR se mantuvieron como se anotó anteriormente; no obstante, en el estado maduro los coeficientes de correlación dejaron de ser significativos.

**Tabla 9.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos, biomecánicos y de dimensión del fruto de guayaba en estado verde maduro.

|     | CM    | DR    | DNR   | TC    | TDC   | EA    | SST   | AT    | RPI   | D     | EP    | CV    |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CM  | 1.00  | 0.79  | -0.79 | 1.00  | 0.97  | 0.98  | -0.20 | 0.33  | 0.79  | 0.24  | -0.10 | 0.28  |
| DR  | 0.79  | 1.00  | -1.00 | 0.80  | 0.78  | 0.78  | -0.35 | 0.48  | 0.78  | -0.02 | -0.58 | 0.51  |
| DNR | -0.79 | -1.00 | 1.00  | -0.80 | -0.78 | -0.78 | 0.35  | -0.48 | -0.78 | 0.02  | 0.58  | -0.51 |
| TC  | 1.00  | 0.80  | -0.80 | 1.00  | 0.96  | 0.99  | -0.19 | 0.35  | 0.80  | 0.21  | -0.12 | 0.26  |
| TDC | 0.97  | 0.78  | -0.78 | 0.96  | 1.00  | 0.91  | -0.16 | 0.27  | 0.71  | 0.34  | -0.10 | 0.36  |
| EA  | 0.98  | 0.78  | -0.78 | 0.99  | 0.91  | 1.00  | -0.21 | 0.38  | 0.83  | 0.12  | -0.12 | 0.20  |
| SST | -0.20 | -0.35 | 0.35  | -0.19 | -0.16 | -0.21 | 1.00  | -0.38 | -0.67 | 0.34  | 0.27  | 0.01  |
| AT  | 0.33  | 0.48  | -0.48 | 0.35  | 0.27  | 0.38  | -0.38 | 1.00  | 0.65  | -0.26 | -0.45 | 0.21  |
| RPI | 0.79  | 0.78  | -0.78 | 0.80  | 0.71  | 0.83  | -0.67 | 0.65  | 1.00  | -0.12 | -0.30 | 0.19  |
| D   | 0.24  | -0.02 | 0.02  | 0.21  | 0.34  | 0.12  | 0.34  | -0.26 | -0.12 | 1.00  | 0.31  | 0.50  |
| EP  | -0.10 | -0.58 | 0.58  | -0.12 | -0.10 | -0.12 | 0.27  | -0.45 | -0.30 | 0.31  | 1.00  | -0.68 |
| CV  | 0.28  | 0.51  | -0.51 | 0.26  | 0.36  | 0.20  | 0.01  | 0.21  | 0.19  | 0.50  | -0.68 | 1.00  |

**Tabla 10.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos, biomecánicos y de dimensión del fruto de guayaba en estado maduro.

|     | CM    | DR    | DNR   | TC    | TDC   | EA    | SST   | AT    | RPI   | D     | EP    | CV    |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CM  | 1.00  | -0.20 | 0.20  | 0.99  | 0.21  | 0.97  | 0.19  | 0.17  | 0.55  | -0.09 | 0.13  | -0.22 |
| DR  | -0.20 | 1.00  | -1.00 | -0.18 | 0.37  | -0.27 | 0.01  | -0.27 | -0.21 | 0.22  | 0.32  | -0.04 |
| DNR | 0.20  | -1.00 | 1.00  | 0.18  | -0.37 | 0.27  | -0.01 | 0.27  | 0.21  | -0.22 | -0.32 | 0.04  |
| TC  | 0.99  | -0.18 | 0.18  | 1.00  | 0.20  | 0.98  | 0.20  | 0.17  | 0.53  | -0.05 | 0.11  | -0.16 |
| TDC | 0.21  | 0.37  | -0.37 | 0.20  | 1.00  | -0.01 | 0.13  | -0.16 | 0.02  | -0.13 | 0.26  | -0.38 |
| EA  | 0.97  | -0.27 | 0.27  | 0.98  | -0.01 | 1.00  | 0.18  | 0.21  | 0.53  | -0.03 | 0.06  | -0.08 |
| SST | 0.19  | 0.01  | -0.01 | 0.20  | 0.13  | 0.18  | 1.00  | -0.31 | -0.70 | 0.55  | 0.49  | 0.17  |
| AT  | 0.17  | -0.27 | 0.27  | 0.17  | -0.16 | 0.21  | -0.31 | 1.00  | 0.52  | -0.36 | -0.57 | 0.11  |
| RPI | 0.55  | -0.21 | 0.21  | 0.53  | 0.02  | 0.53  | -0.70 | 0.52  | 1.00  | -0.56 | -0.37 | -0.28 |
| D   | -0.09 | 0.22  | -0.22 | -0.05 | -0.13 | -0.03 | 0.55  | -0.36 | -0.56 | 1.00  | 0.51  | 0.65  |
| EP  | 0.13  | 0.32  | -0.32 | 0.11  | 0.26  | 0.06  | 0.49  | -0.57 | -0.37 | 0.51  | 1.00  | -0.33 |
| CV  | -0.22 | -0.04 | 0.04  | -0.16 | -0.38 | -0.08 | 0.17  | 0.11  | -0.28 | 0.65  | -0.33 | 1.00  |

Estos resultados indicaron que la madurez es el factor más importante que modifica las propiedades biomecánicas de los frutos. También se determinó que el espesor del pericarpio, el diámetro de la fruta y el diámetro de la cavidad de las semillas no tuvieron influencia significativa en esas propiedades biomecánicas del fruto. También estos análisis demostraron que los sólidos solubles totales o °Brix y la acidez titulable alcanzados en los diferentes estados de madurez no se correlacionaron con las propiedades mecánicas del fruto; no obstante, el RPI (que incluye estos valores y la CM) sí mostró correlaciones significativas con las propiedades mecánicas, señalándose con esto que los cambios en las propiedades biomecánicas están influidos por el estado de madurez y por los cambios estructurales que el tejido sufre en ese proceso de maduración. Por ello, el RPI es un buen indicador del estado de madurez y puede ser utilizado como indicador de la maduración de los frutos. Por lo anterior, en los siguientes experimentos se utilizó el RPI para indicar el estado de madurez de los frutos.

Estos resultados difieren de lo observado por Li *et al.*, (2015) en frutos de tomate donde observaron que la contribución del exocarpo en la dureza de la fruta aumentó a medida que transcurrió la maduración.

## **7.4 Aplicación de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en pre-cosecha**

### **7.4.1 Contenido de calcio en el fruto.**

Independientemente de los efectos que tengan las aplicaciones de calcio en la resistencia mecánica de los frutos; se espera que el contenido de este mineral en el tejido se incremente de manera dependiente a la concentración aplicada. La concentración de calcio en los frutos tratados con 1 % fue estadísticamente similar que los frutos control, por otro lado las aplicaciones foliares de 2 y 3 % de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , mostraron contenidos significativamente mayores al grupo control pero significativamente similares entre sí (Tabla 11). Un comportamiento similar fue observado en frutos de manzana, fresa y durazno, con las aplicaciones foliares de  $\text{CaCl}_2$ , donde se observó que a mayor concentración de  $\text{CaCl}_2$  mayor contenido de

calcio en los frutos (Erincik *et al.*, 1998; Manganaris *et al.*, 2007; Peryea y Neilsen, 2006).

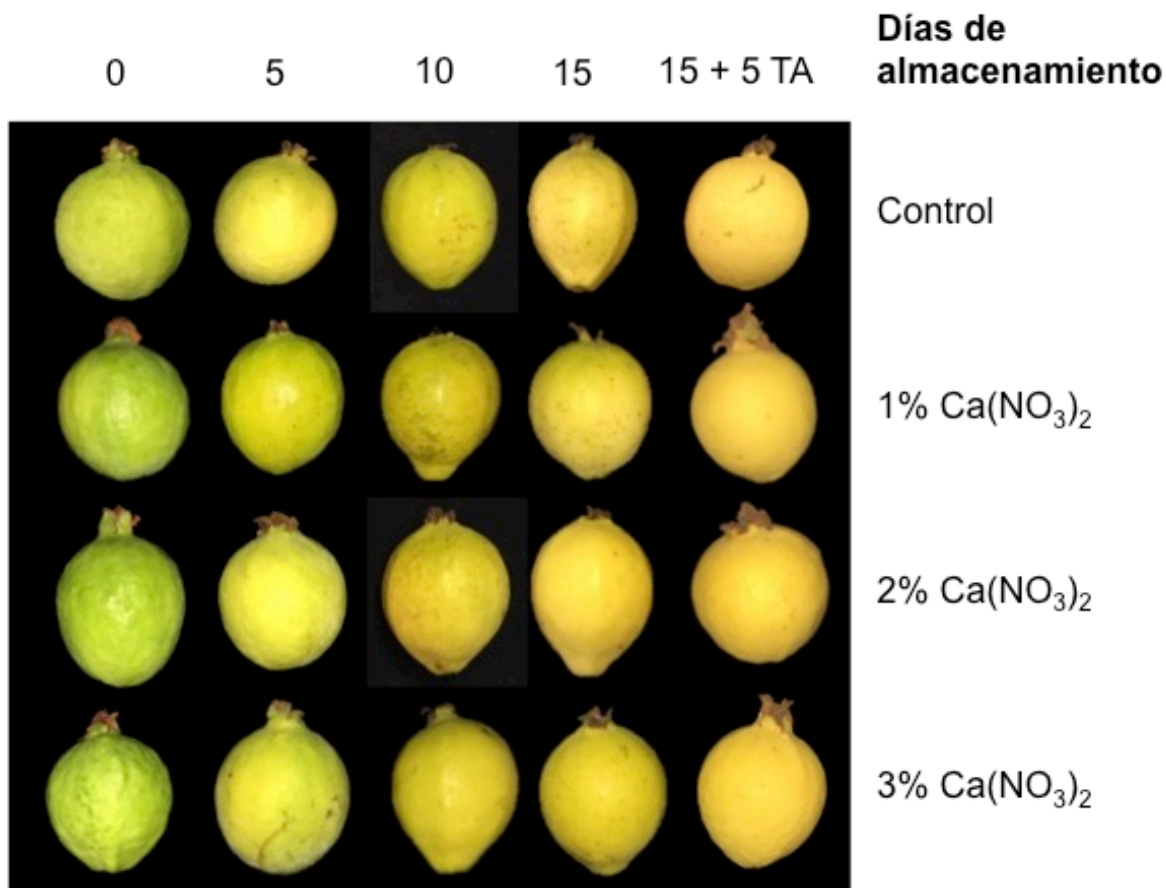
**Tabla 11.** Contenido de calcio en frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

| <b>Tratamientos</b>                             | <b>% Ca</b>         |
|-------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Control</b>                                  | 0.1565 <sup>c</sup> |
| <b>1% <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math></b> | 0.1525 <sup>c</sup> |
| <b>2% <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math></b> | 0.1905 <sup>b</sup> |
| <b>3% <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math></b> | 0.2085 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

#### 7.4.2 Calidad Visual

La calidad visual de los frutos tratados con calcio no presentó un efecto respecto a los frutos control, presentándose una apariencia externa aceptable en todos los tratamientos (Figura 31). Estos resultados sugieren que el Ca no interviene en los procesos fisiológicos del fruto, tal como lo menciona Aghdam *et al.*, (2012). Un comportamiento diferente fue observado por Mandal *et al.*, (2010) en frutos de guayaba de la variedad 'Sardar' tratada en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (0.5, 1.0 y 1.5%), donde observaron que los frutos con mejor color y sabor fueron los tratados con la concentración de calcio más alta (1.5 %). Por otro lado, se ha observado en duraznos de la variedad 'Andros' tratados en poscosecha con diferentes concentraciones de cloruro de calcio, lactato de calcio y propionato de calcio, que concentraciones mayores de 6% pueden ser perjudiciales para la fruta debido a que se origina un incremento en el ablandamiento y se ve reflejado en su calidad visual (Manganaris *et al.*, 2007).

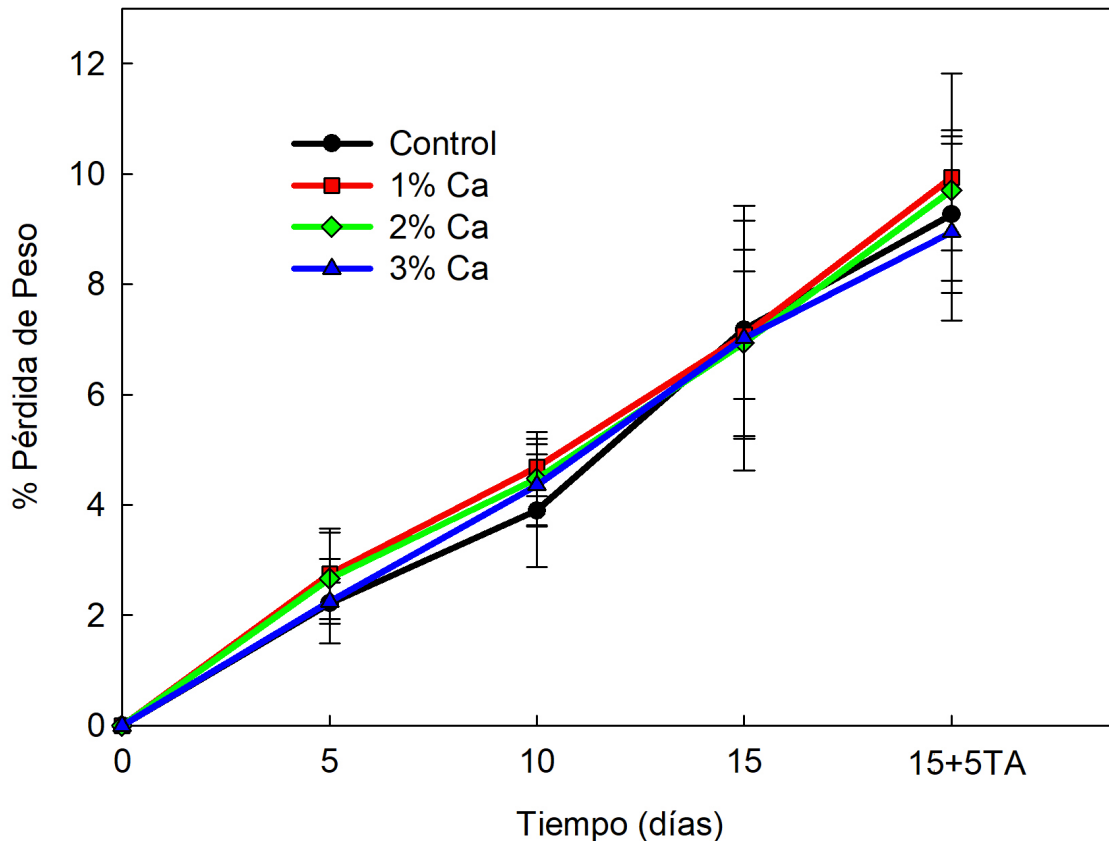


**Figura 31.** Calidad visual de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  almacenados 5, 10, y 15 días a 10 °C y 15 días a 10 °C más 5 días a 20 °C.

### 7.4.3 Cambios en la pérdida de peso

La pérdida de peso incrementó durante todo el almacenamiento en todos los frutos tratados, no presentando diferencias significativas entre ellos (Figura 32). Los resultados observados podrían sugerir que el calcio no está participando en el metabolismo del fruto. Un comportamiento diferente ha sido reportado por Mandal *et al.*, (2010) en frutos de guayaba 'Sadar' tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (0.5, 1.0 y 1.5%), donde observaron que a mayor concentración de calcio menor pérdida de peso. De igual forma, Gopi y Hari (2002) reportaron que frutos de guayaba 'Allahabad Safeda' que los frutos tratados con

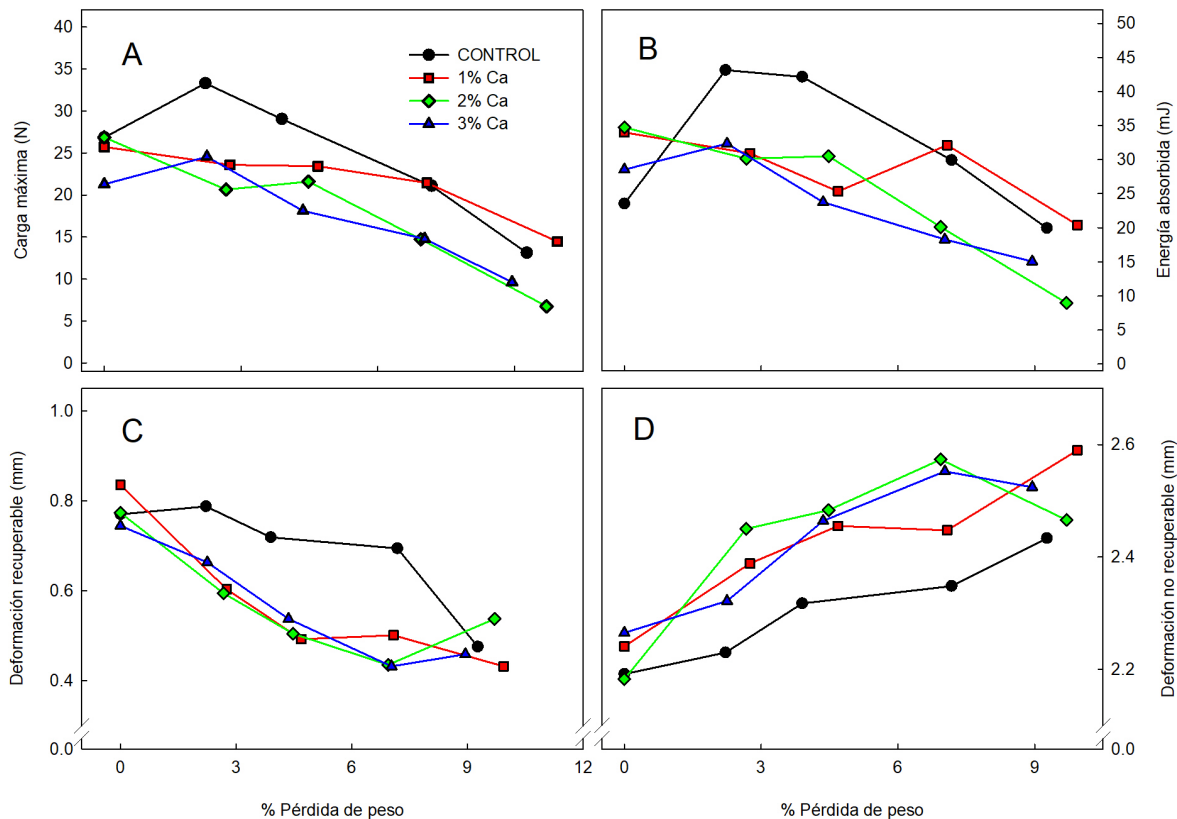
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  presentaron una menor pérdida de peso en comparación con los frutos tratados con  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 32.** Cambios en la pérdida de peso de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

En el experimento anterior, se observó que la pérdida de agua podría ser un factor determinante en la pérdida de firmeza. Por lo tanto, en este estudio al comparar todas las propiedades mecánicas con la pérdida de peso se pudo observar que tanto la carga máxima, la energía absorbida, la deformación recuperable y la deformación no recuperable están directamente relacionadas con dicho parámetro (Figuras 33 A, B, C y D), siendo la deformación recuperable y no recuperable las propiedades mecánicas que más se ven afectadas. Estos resultados nos podrían sugerir que las propiedades mecánicas son fuertemente afectadas por la pérdida de agua.





**Figura 33.** Relación de la pérdida de peso con las propiedades biomecánicas de frutos de guayaba tratados con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en pre-cosecha y almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. Carga máxima (A), energía absorbida (B), deformación recuperable (C) y deformación no recuperable (D).

#### 7.4.4 Análisis de resistencia mecánica

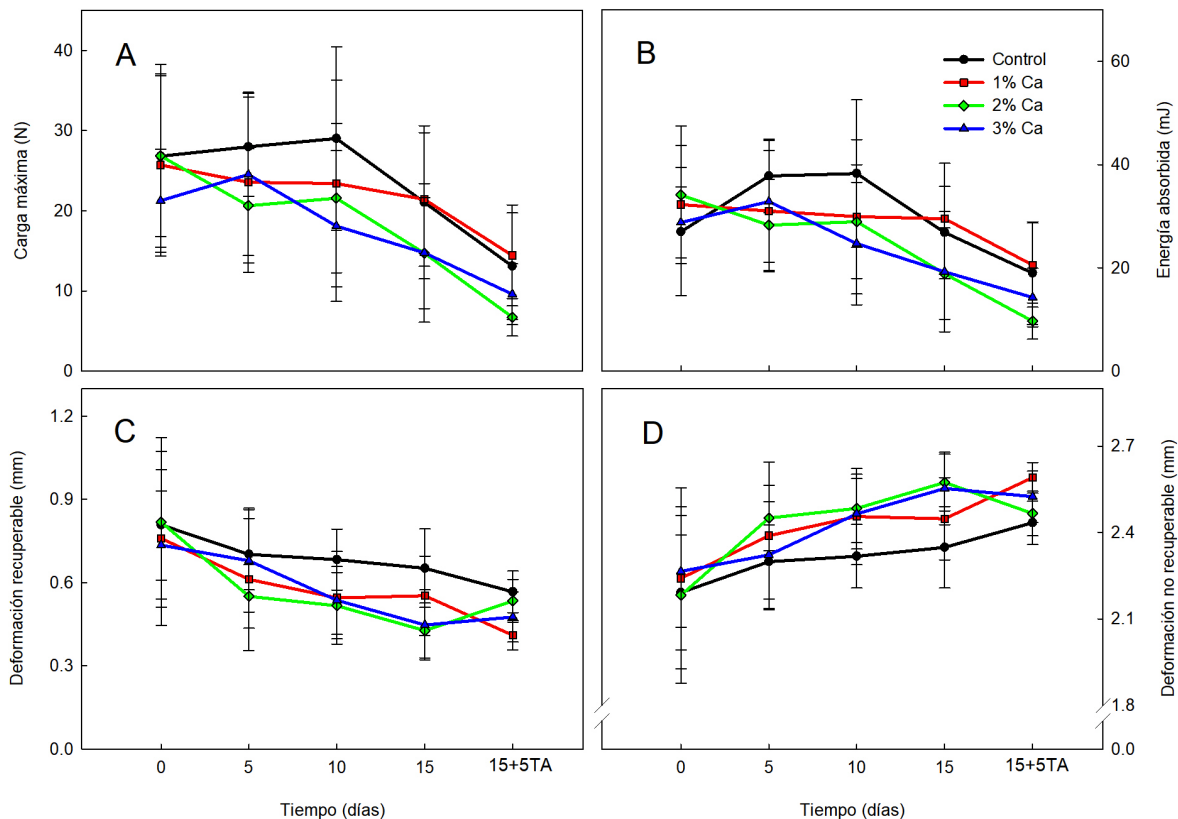
El comportamiento mecánico de los frutos de guayaba se estimó mediante los parámetros de carga máxima (CM), energía absorbida (EA), deformación recuperable (DR) y no recuperable (DNR) generados del reograma obtenidos de la prueba de esfuerzo-relajación (Mohsenin, 1970).

La CM, EA y DR, disminuyeron a lo largo del almacenamiento (Figuras 34 A, B y C), mientras que la DNR incrementó (Figura 34 D). Estos resultados sugieren

que dichas propiedades están directamente relacionadas con el proceso de maduración de los frutos, y confirman lo observado en la sección 7.3.

En cuanto a la CM, al final del almacenamiento, los frutos tratados con 1%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y el tratamiento control presentaron la mayor CM (14.5 N y 13.4 N, respectivamente), en comparación con el tratamiento con 2 y 3 %  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (6.7 N y 9.6 N, respectivamente) (Figura 34 A). Un comportamiento diferente fue observado en frutos de guayaba de la variedad 'Sardar' tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (0.5, 1.0 y 1.5%), donde a mayor concentración de calcio mayor firmeza en los frutos (Mandal *et al.*, 2010). Por otro lado, Manganaris *et al.*, (2007), reportaron en duraznos de la variedad 'Andros' tratados por inmersión con diferentes concentraciones de cloruro de calcio, lactato de calcio y propionato de calcio, que concentraciones mayores de 6% pueden ser perjudiciales para los frutos debido a que se observó un incremento en el ablandamiento.

En cuanto a la EA, DR y DNR, se observa que los tratamientos con calcio presentaron una menor EA y DR, y una mayor DNR respecto al tratamiento control (Figuras 34 B, C y D). Yurtlu y Erdogan, (2005) calculando la energía absorbida de frutos de pera 'Ankara' después de una prueba de impacto también observaron que esta disminuía durante el almacenamiento; estos autores señalaron que dicha energía estuvo directamente relacionada con un incremento en el volumen de magullamiento. En nuestro estudio, no se realizaron estas determinaciones, si se observaron daños visibles en frutos maduros después del proceso de compresión. Un comportamiento diferente fue reportado por Yuwana y Duprat (1998) en manzanas 'Golden Delicious' almacenada a 0 °C quienes indicaron que la energía absorbida disminuyó, y que el nivel de el magullamiento no se correlacionó con la energía absorbida.



**Figura 34.** Cambios en la carga máxima (A), energía absorbida (B), deformación recuperable (C) y deformación no recuperable (D) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

Estos resultados sugieren que las altas concentraciones de calcio aceleran el proceso de maduración, afectando las propiedades mecánicas de los frutos de guayaba 'Media China', siendo la deformación recuperable y no recuperable las propiedades que mejor explican su comportamiento viscoelástico.

El incremento de las concentraciones de calcio citosólico provocan la activación de proteínas cinasas que son dependientes de calcio (CDPKs) (White y Broadley, 2003). Estas proteínas participan en la fosforilación de la enzima ACC sintasa (ACS) que cataliza el paso limitante en la biosíntesis del etileno, activando su producción y así acelerando la maduración e incrementando el ablandamiento de

los frutos (Sebastia *et al.*, 2004; Tatsuki y Mori, 2001). Esto podría explicar lo observado en este estudio en las propiedades mecánicas.

Por otro lado, al incrementarse el calcio citosólico, se inhiben las enzimas  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa y  $\text{H}^{+}$ -ATPasa (enzimas que regulan el calcio dentro de la célula), e incrementan la actividad de la enzima fosfolipasa D (FLD), principal enzima que inicia el catabolismo de los lípidos de membrana (Paliyath *et al.*, 2008; Pinhero *et al.*, 2003). Esto ha sido reportado en fresas de las variedades 'Aromas' y 'Seascape' donde las altas concentraciones de calcio citosólico incrementan la actividad de FLD en membranas mitocondriales y microsomales (Yuan *et al.*, 2005). Por su parte, Pinhero *et al.* (2003), reportaron en tomate transgénico que al suprimir el gen que codifica para la enzima FLD, su actividad disminuye y la firmeza se mantiene en comparación con la fruta silvestre. Esto sugiere que nuestros resultados en firmeza también podrían estar relacionados con la pérdida de la integridad de la membrana celular por la actividad de FLD pues los frutos control mostraron menor deformación no recuperable y mayor deformación recuperable.

#### **7.4.5 Cambios en el contenido de sólidos solubles totales (SST) y acidez titulable (AT)**

Durante el almacenamiento se observa un incremento en el contenido de sólidos solubles totales en todos los tratamientos; así mismo se observa un ligero incremento en la acidez titulable, no presentando diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 12). Un comportamiento similar fue observado en frutos de guayaba de la variedad 'Media China' de la temporada otoño-invierno, donde se observó que la acidez titulable se mantiene durante las diferentes etapas de maduración (Mercado-Silva *et al.*, 1998). El incremento observado en el contenido de sólidos solubles totales es característico de un fruto climatérico y podría deberse a la hidrólisis del almidón en azúcares simples (Singh *et al.*, 2014). Dicho comportamiento indicó que la maduración no fue afectada por la aplicación de los tratamientos pre-cosecha.

**Tabla 12.** Cambios en el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable (AT) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

| TRAT           | Periodo de almacenamiento (días) |                   |                   |                    |                    |                   |                   |                   |                   |                   |
|----------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                | SST                              |                   |                   |                    |                    | AT                |                   |                   |                   |                   |
|                | 0                                | 5                 | 10                | 15                 | 15+5TA             | 0                 | 5                 | 10                | 15                | 15+5TA            |
| <b>Control</b> | 9.56 <sup>a</sup>                | 8.81 <sup>a</sup> | 8.81 <sup>a</sup> | 11.90 <sup>a</sup> | 11.18 <sup>a</sup> | 0.61 <sup>a</sup> | 0.64 <sup>a</sup> | 0.64 <sup>a</sup> | 0.72 <sup>a</sup> | 0.72 <sup>a</sup> |
| <b>1% Ca</b>   | 9.94 <sup>a</sup>                | 8.88 <sup>a</sup> | 8.44 <sup>a</sup> | 11.69 <sup>a</sup> | 11.38 <sup>a</sup> | 0.59 <sup>a</sup> | 0.57 <sup>a</sup> | 0.63 <sup>a</sup> | 0.75 <sup>a</sup> | 0.75 <sup>a</sup> |
| <b>2% Ca</b>   | 10.63 <sup>a</sup>               | 8.31 <sup>a</sup> | 8.50 <sup>a</sup> | 11.19 <sup>a</sup> | 11.56 <sup>a</sup> | 0.63 <sup>a</sup> | 0.66 <sup>a</sup> | 0.69 <sup>a</sup> | 0.74 <sup>a</sup> | 0.60 <sup>a</sup> |
| <b>3% Ca</b>   | 10.56 <sup>a</sup>               | 8.94 <sup>a</sup> | 8.56 <sup>a</sup> | 12.19 <sup>a</sup> | 11.63 <sup>a</sup> | 0.57 <sup>a</sup> | 0.66 <sup>a</sup> | 0.64 <sup>a</sup> | 0.70 <sup>a</sup> | 0.66 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

#### 7.4.6 Cambios en el índice de madurez (Ripening Index; RPI)

Durante el almacenamiento el RPI disminuye en todos los tratamientos. Al final del almacenamiento los frutos control y los tratados con 1 % de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  presentaron los mayores valores de RPI, respecto a los frutos tratados con 2 y 3 % de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Tabla 13). Los menores valores observados en las altas concentraciones de calcio nos sugiere que los frutos se encuentran en un estado de madurez más avanzado, ya que dicho parámetro al relacionar la carga máxima, la acidez titulable y el contenido de sólidos solubles totales, nos define de manera más eficiente la madurez de los frutos. Un comportamiento similar fue observado en mango de la variedad 'Osteen', donde se observó que el fruto más maduro presentó el menor índice de maduración (Cortés *et al.*, 2016).

Estos resultados nos podrían corroborar que el calcio está acelerando el proceso de maduración en los frutos de guayaba 'Media China', como ya se discutió en la sección 7.4.3.

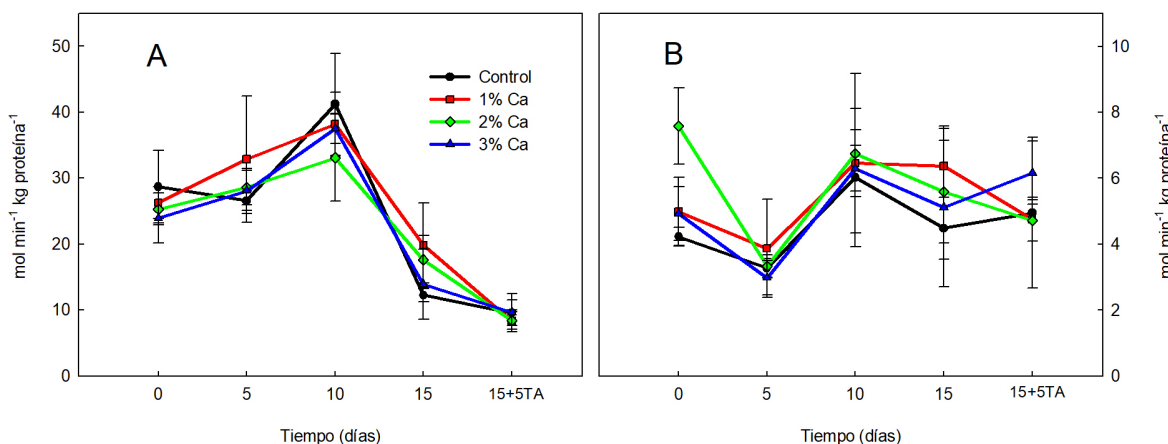
**Tabla 13.** Cambios en el índice de madurez (RPI) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

| Tratamiento                                     | Período de almacenamiento |                   |                   |                   |                   |
|-------------------------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                 | RPI                       |                   |                   |                   |                   |
|                                                 | 0                         | 5                 | 10                | 15                | 15+5TA            |
| <b>Control</b>                                  | 5.1 <sup>a</sup>          | 5.4 <sup>a</sup>  | 5.3 <sup>a</sup>  | 4.8 <sup>a</sup>  | 4.3 <sup>a</sup>  |
| <b>1% <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math></b> | 4.9 <sup>ab</sup>         | 5.0 <sup>ab</sup> | 5.0 <sup>ab</sup> | 4.8 <sup>ab</sup> | 4.5 <sup>ab</sup> |
| <b>2% <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math></b> | 5.0 <sup>bc</sup>         | 5.0 <sup>bc</sup> | 5.1 <sup>bc</sup> | 4.5 <sup>bc</sup> | 3.5 <sup>bc</sup> |
| <b>3% <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math></b> | 4.7 <sup>c</sup>          | 5.1 <sup>c</sup>  | 4.8 <sup>c</sup>  | 4.3 <sup>c</sup>  | 3.9 <sup>c</sup>  |

<sup>a</sup>Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

#### 7.4.7 Cambios en la actividad enzimática de pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG).

La actividad de PME y PG se ha relacionado directamente relacionada con la pérdida de firmeza en diferentes frutas (Posé *et al.*, 2015). En este estudio, aunque hubo cambios de las actividades durante el almacenamiento, no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Figura 35). La PME mostró actividades relativamente altas hasta los 10 días y disminuyeron hasta el final del almacenamiento. Por su parte, la actividad de PG fue alta al inicio del almacenamiento en el tratamiento de 2% de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , después todos los tratamientos parecen disminuir su actividad, seguido de un aparente incremento en el día 10 y después una tendencia a disminuir hasta el final del almacenamiento. No obstante, no existió una correlación con los cambios en la resistencia mecánica de los frutos, lo cual parece indicar que la actividad de éstas enzimas no parece estar directamente relacionada con el proceso de ablandamiento.



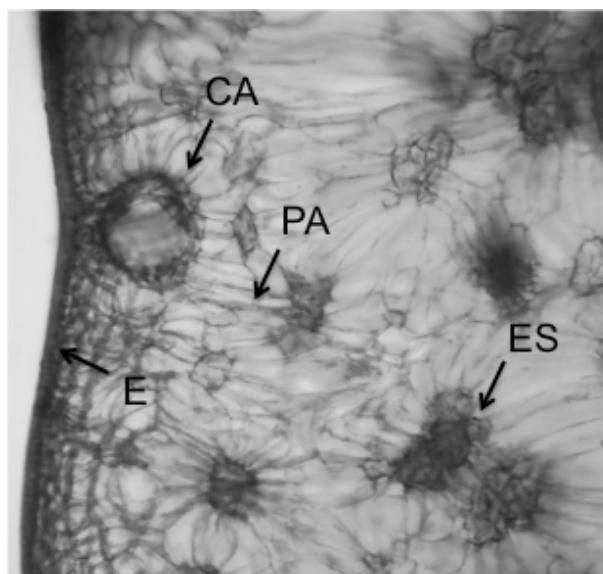
**Figura 35.** Cambios en la actividad de PME (A) y PG (B) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

Abu-Goukh y Bashir, (2003) reportaron un comportamiento similar de las actividades de estas enzimas en frutos de guayaba blanca y rosada sin aplicaciones de calcio, donde la actividad de PME alcanzó un máximo y posteriormente disminuyó hasta el final del almacenamiento. La actividad de PG, también incrementó durante la maduración y su actividad se correlacionó con la pérdida de firmeza de dichos frutos. Nuestros datos confirman esa tendencia en los frutos control, pero las aplicaciones de Ca no alteraron esos perfiles de actividad. En contraste con nuestros estudios, Kitemmann *et al.*, (2010) infiltrando manzana ‘Elstar’ con  $\text{CaCl}_2$  observaron que los tratamientos disminuyeron la producción de etileno y retrasaron el ablandamiento aunque las actividades de las enzimas de degradación de pared celular incrementaron su actividad. Estos datos sugieren que la presencia de calcio en frutos de guayaba no alteró la actividad de las enzimas de degradación de pectinas ni el proceso de ablandamiento de los frutos.

#### 7.4.8 Observaciones histoquímicas

Las observaciones histológicas del exocarpo mostraron células epidérmicas que van de formas rectangulares a alargadas cubiertas con una cutícula delgada;

seguida de células del colénquima con reserva de sustancias ergásticas, que se vierten en cavidades o canales multicelulares; una capa gruesa de células del parénquima con paredes delgadas y poligonales, conteniendo muchos grupos de esclereidas o células pétreas, las cuales le dan la textura arenosa característica del fruto de guayaba y constituyen cerca del 78% (Figura 36), dichas células tienen una fuerte lignificación de las paredes celulares (Azcárraga *et al.*, 2010).



**Figura 36.** Corte histológico del fruto de guayaba 'Media China' mostrando epidermis (E), cavidad multicelular (CA), parénquima (PA) y esclereidas (ES).

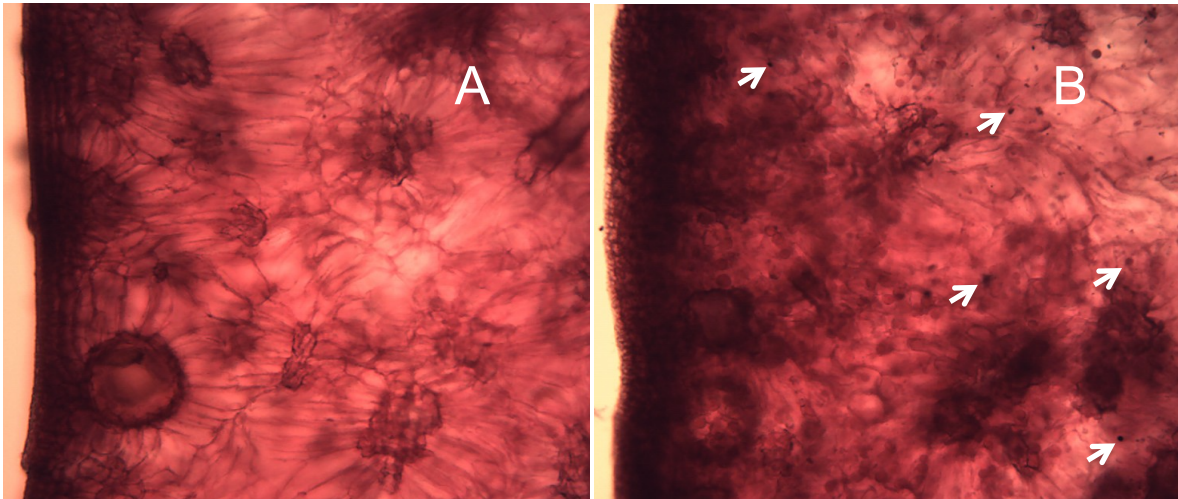
Las pectinas de las paredes celulares en el tejido de los frutos fueron teñidas con rojo de rutenio para observarlas con un color rosado o rojo intenso (Johansen, 1940), para mostrar los efectos de la aplicación de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Una mayor intensidad del color rojo en las paredes sugiere la formación de pectinas en los frutos de guayaba. En contraste con los frutos control, el tratamiento con 2 y 3 % de Ca mostraron las paredes celulares intensamente teñidas sugiriendo una mayor presencia de pectinas (probablemente pectatos de calcio); también se observaron estructuras grandes teñidas de rojo intenso, las cuales corresponden a las esclereidas (Figura 37). Un aspecto notable de estas observaciones histoquímicas fue la presencia de acumulaciones de pectinas al interior de las células especialmente en el tejido de frutos tratados con 3 % de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  donde



se observó un mayor número de estas estructuras (Figuras 37 y 38). Estas estructuras también fueron observadas por Abreu *et al.*, (2012) durante el proceso de maduración de guayaba 'Pedro Sato', estos autores indicaron que estas acumulaciones de pectinas, en el interior de la célula, se incrementaban a medida que transcurrió la maduración de los frutos. Nuestras observaciones, señalan que los frutos control mostraban un menor número de estas estructuras en comparación con los frutos tratados. Aunque no se conoce el mecanismo bioquímico por el cual ocurre esta acumulación, parece ser que este proceso se vio acelerado por el mayor contenido de Ca en el tejido.

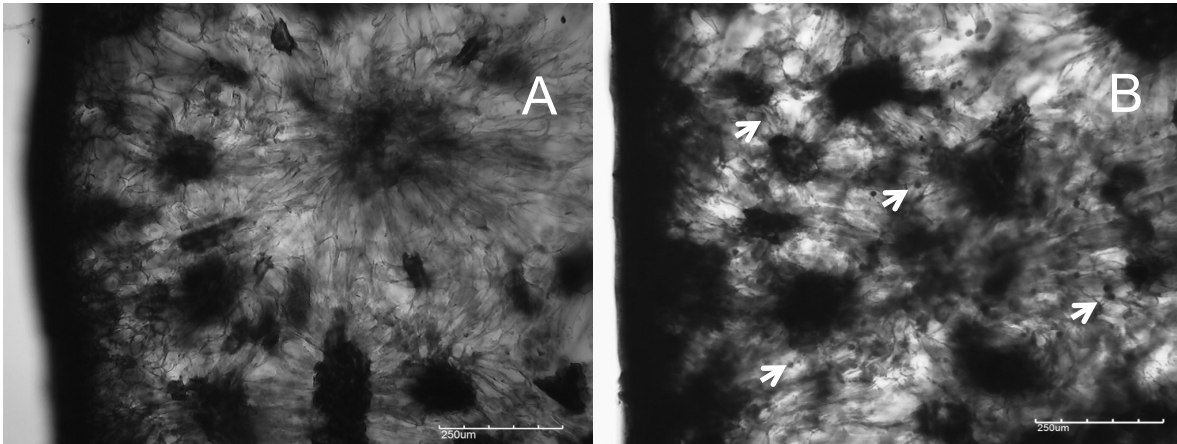
Las muestras de los tejidos que fueron utilizados para las observaciones, fueron tomadas un día después de la cosecha; las actividades de las enzimas PME y PG se muestran en la Figura 35; al inicio del almacenamiento (un día después de la cosecha), la actividad de PG fue mayor en las muestras de 3 % de Ca respecto de los frutos control. Esto puede sugerir que la actividad de esta enzima pudiera estar relacionada con dicho proceso de acumulación interna de las pectinas, aunque falta mas investigación para establecer una relación que confirme esta hipótesis.

Xisto *et al.*, (2004) reportaron que las aplicaciones de  $\text{CaCl}_2$  en poscosecha indujeron una menor proporción de pectinas solubles en guayabas 'Pedro Sato'; aunque en este trabajo no se analizó este polisacario, es posible que los tratamientos en pre-cosecha de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  también pudieran alterar el metabolismo de las pectinas provocando una mayor acumulación de ellas al interior de los frutos.



**Figura 37.** Corte histoquímico de frutos de guayaba teñidos con rojo de rutenio mostrando pectinas en paredes celulares en tratamiento control (A) y tratamiento con 3% de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (B). Obsérvese una mayor intensidad en las paredes celulares de los frutos tratados y acumulación interna de pectinas →.

Los pectatos de calcio fueron identificados por un color negro o azul oscuro mediante la tinción con ácido tánico (Sandoval, 2005). Los tratamientos con calcio mostraron mayor intensidad del color en comparación con el tratamiento control (Figura 38), confirmando lo observado mediante la técnica de rojo de rutenio. También bajo esta tinción se observó la acumulación de pectinas al interior de las células.



**Figura 38.** Tinción de pectatos de calcio mediante ácido tánico en frutos de guayaba control (A) y tratada con 3% de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (B). Se observan pectinas acumuladas al interior de las células →.

Estos resultados en su conjunto indicaron que los tratamientos de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en pre-cosecha inducen acumulación del mismo en las paredes celulares pero que estas acumulaciones no presentaron un efecto significativo para mantener la firmeza de los frutos. No obstante, fue posible detectar que el metabolismo de las pectinas durante la maduración involucra un traslado de las mismas hacia el interior de las células y que este proceso parece ser favorecido por los tratamientos de calcio al 3 % aplicados.

### **7.5 Efectos de las aplicaciones pre-cosecha de $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ en la vida poscosecha**

La cosecha de los frutos tratados con Selenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) se retrasó 60 días respecto de los frutos control. Un comportamiento similar fue observado en tomate tratado con diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  (2.5, 5 y 10  $\text{mg L}^{-1}$ ), donde también se señaló que todas las concentraciones retrasaron la cosecha de los frutos (Pezzarossa *et al.*, 1999).

Este efecto importante sobre el desarrollo y maduración de los frutos puede estar ligado al metabolismo del selenio (Se) que sigue la misma ruta de asimilación del azufre (S), dado que ambos elementos tienen muchas similitudes químicas, y por lo tanto, las enzimas involucradas en el metabolismo del S pueden

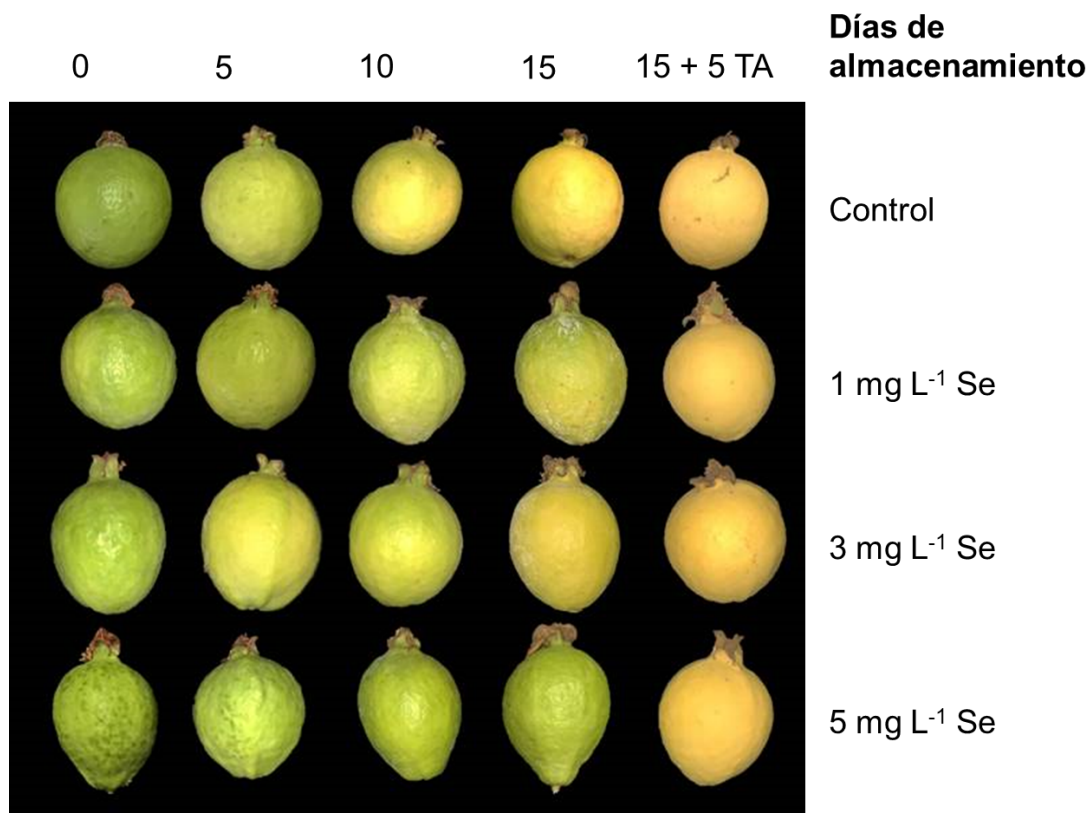
catalizar reacciones análogas con los correspondientes sustratos del Se, formando productos finales de su asimilación como la selenocisteína o selenometionina (Anderson, 1993). La selenocisteína y selenometionina pueden ser incorporadas en proteínas, cambiando su estructura espacial de la proteína con lo que pierde la forma normal de plegamiento de la cisteína, y por ello su actividad enzimática podría verse afectada (Van Hoewyk, 2013). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la formación de selenometionina disminuye la metionina libre, principal sustrato en la síntesis de etileno, provocando una disminución en la producción de etileno y así retrasando la maduración de los frutos de guayaba 'Media China'.

Este aspecto fue señalado por Zhu *et al.*, (2017), quienes indicaron que la aplicación foliar de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en tomate *Solanum lycopersicon* cv. 'Provence' disminuyó la producción de etileno debido a una supresión transcripcional de los genes ACS2, ACS4 y ACO1, que codifican para la actividad de las principales enzimas de la ruta de síntesis de etileno, ACC-sintasa (ACS) y ACC-oxidasa (ACO). Esto podría explicar el retraso en la maduración de los frutos de guayaba 'Media China'.

### 7.5.1 Calidad visual

En la figura 39 se muestra el efecto de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  sobre la calidad visual de los frutos. Durante el almacenamiento a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , los frutos tratados con  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  mostraron un mayor retraso en el proceso de maduración, seguidos por los frutos tratados con  $1 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ , mientras que los frutos tratados con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  y el tratamiento control presentaron la madurez más avanzada. Al ser transferidos a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  todos los tratamientos presentaron un proceso normal de maduración y una apariencia externa aceptable (Figura 39). Estos resultados sugieren que el selenio tiene efectos importantes en el proceso de maduración de los frutos, lo cual podría ayudar a incrementar su vida poscosecha a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , sin afectar su proceso de maduración al ser transferidos a temperaturas de comercialización ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Un comportamiento similar fue observado por Zhu *et al.*, (2017) en frutos de tomate '*Solanum lycopersicon*' cv. 'Provence', señalando que

la aplicación de 1 mg L<sup>-1</sup> de selenato de sodio en pre-cosecha retrasó la maduración durante su almacenamiento poscosecha manteniendo su calidad visual.

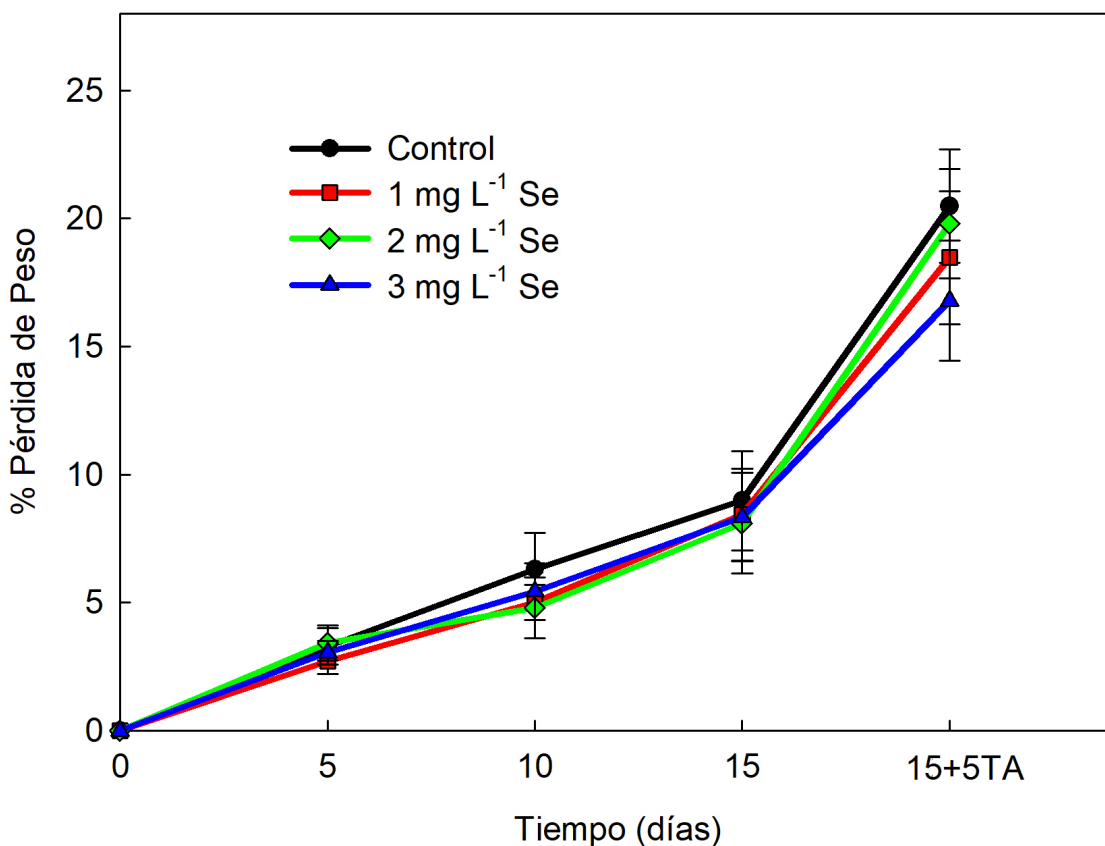


**Figura 39.** Calidad visual de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

### 7.5.2 Cambios en la pérdida de peso

La pérdida de peso incrementó gradualmente durante los 20 días de almacenamiento en todos los tratamientos (Figura 40). A temperatura de 10 °C no se presentan diferencias significativas entre el tratamiento control y los tratamientos con selenio. No obstante, en frutos transferidos a 20 °C, los tratamientos con 1 y 5 mg L<sup>-1</sup> presentaron la menor pérdida de peso (18.5 y 16.8%, respectivamente), respecto de los tratamientos control y el tratamiento con 3 mg L<sup>-1</sup> (20.8 y 19.8%, respectivamente). Este comportamiento también fue reportado por Zhu *et al.* (2017), quienes señalaron que la aplicación de 1 mg L<sup>-1</sup> de

selenato de sodio en tomate (*Solanum lycopersicon* cv. 'Provence'), presentó la menor pérdida de peso, menor tasa de respiración y menor producción de etileno.

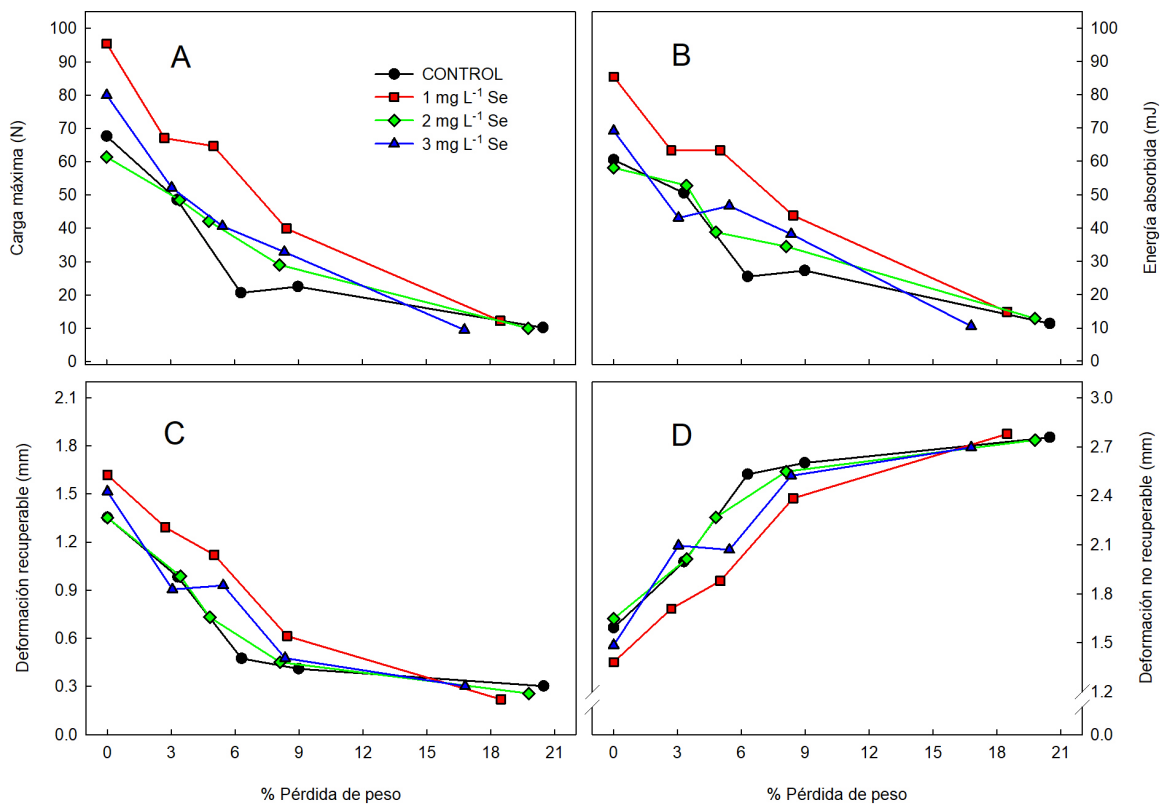


**Figura 40.** Cambios en la pérdida de peso de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

La menor pérdida de peso observada en los frutos de guayaba 'Media China' en los tratamientos con 1 y 5 mg L<sup>-1</sup> transferidos a 20 °C sugiere un retraso o disminución en la velocidad de respiración debida a una menor producción de etileno con lo cual podría reducir la pérdida de agua manteniendo la apariencia, elasticidad y turgencia y probablemente mejorando la firmeza de los frutos.

En los experimentos descritos previamente se señaló que las propiedades mecánicas están directamente relacionadas con la pérdida de agua o pérdida de peso. En este estudio, la carga máxima, la energía absorbida y la deformación

recuperable disminuyen conforme se incrementó la pérdida de peso, mientras que la deformación no recuperable incrementó (Figuras 41 A, B, C y D). El tratamiento control con 6% de pérdida de peso, sus propiedades mecánicas disminuyen drásticamente aunque a mayores pérdidas de peso no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Por otro lado, durante los primeros 15 días de almacenamiento, los frutos tratados con 1 mg L<sup>-1</sup> mostraron mayores valores de CM, EA y DR para pérdidas de peso equivalentes de los otros tratamientos, mientras que la DNR fue menor respecto de los otros tratamientos dentro del mismo periodo de almacenamiento. Al término del almacenamiento todos los tratamientos no mostraron diferencias significativas.



**Figura 41.** Relación de la pérdida de peso con las propiedades biomecánicas de frutos de guayaba tratados con diferentes concentraciones de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> en pre-cosecha y almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C. Carga máxima (A), energía absorbida (B), deformación recuperable (C) y deformación no recuperable (D).

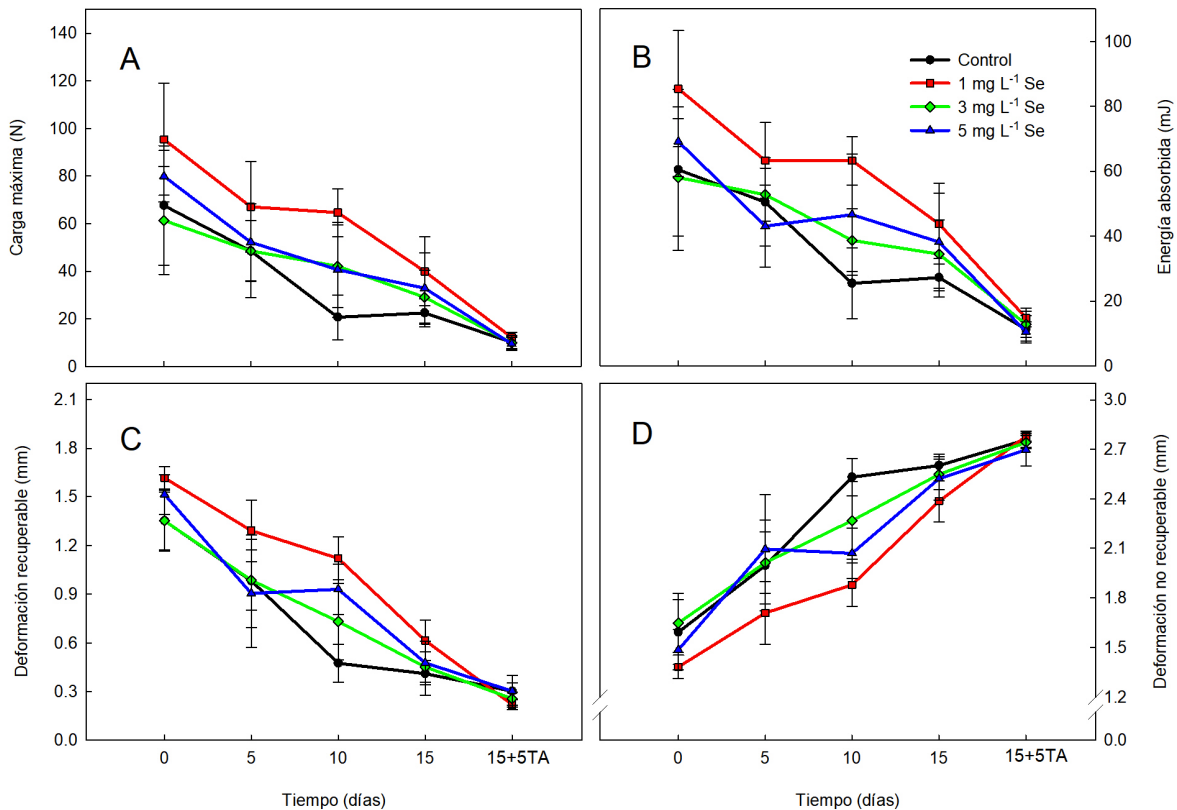
Estos resultados señalaron que el tratamiento con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de selenato mejoró las características mecánicas de los frutos.

### 7.5.3 Análisis de la resistencia mecánica

Así como en el experimento anterior, se observa que la CM, EA y DR disminuyen durante el almacenamiento, mientras que la DNR incrementa (Figuras 42 A, B, C y D). De igual forma se observa que dichas propiedades son afectadas de manera importante por el estado de madurez de los frutos. En cuanto a la CM, EA, DR y DNR durante el almacenamiento a  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , el tratamiento con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  presentó los mejores valores (39.9 N, 43.8 mJ, 0.61 mm y 2.39 mm, respectivamente), seguido por el tratamiento con  $5 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  (32.9 N, 38.2 mJ, 0.48 mm y 2.52 mm, respectivamente), mientras que el tratamiento con  $3 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  y el tratamiento control presentaron los menores valores (29.1N, 34.5 mJ, 0.45 mm y 0.45 mm; y 22.5 N, 30.4 mJ, 0.45 mm y 2.57 mm, respectivamente). No obstante, al ser transferidos a temperatura de  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  todos los tratamientos disminuyeron su CM, EA y DR, e incrementó su DNR. Un comportamiento similar fue observado en frutos de durazno (*Prunus persica* Batch., cv. 'Flavorcrest'), pera (*Pyrus communis* L., cv. 'Conference') y tomate (*S. lycopersicon*, cv. 'Provence'), donde se observó que la aplicación en pre-cosecha de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de selenato de sodio permitió desarrollar la mayor carga máxima en los frutos (Pezzarossa *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2017).

Por otro lado, la menor DR y mayor DNR, observada en los frutos de guayaba 'Media China' tratados con  $1 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  nos podría estar indicando que al retrasar la maduración, se disminuye la pérdida de agua, y el fruto se hace menos viscoelástico y así se disminuye su deformación.





**Figura 42.** Cambios en la carga máxima (A), energía absorbida (B), deformación recuperable (C) y deformación no recuperable (D) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

Nuestros resultados nos sugieren que el selenio altera el metabolismo de los frutos para mantener sus propiedades mecánicas en los frutos de guayaba 'Media China', retrasa su maduración mediante la disminución de enzimas involucradas en la producción de etileno. En este sentido, Zhu *et al.*, 2017, confirmaron que la aplicación de 1 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  en tomate (*Solanum lycopersicon*, cv. 'Provence') disminuyó la producción de etileno debido a la supresión transcripcional de los genes ACS2, ACS4 y ACO1, los cuales codifican para la síntesis de las principales enzimas, ACC-sintasa (ACS) y ACC-oxidasa (ACO), involucradas en la síntesis de etileno. También es posible que la menor actividad de estas enzimas podría deberse a que el metabolismo del selenio sigue la misma ruta de asimilación del S, por sus similitudes químicas, y por lo tanto afectando las estructuras de las enzimas involucradas en el metabolismo del S pueden catalizar

reacciones análogas con los correspondientes sustratos del Se, formando productos finales de su asimilación como son la selenocisteína o selenometionina, e incorporarse a las proteínas afectando su actividad catalítica (Anderson, 1993; Bottino *et al.*, 1984; Brown y Shrift, 1980).

#### **7.5.4 Cambios en el contenido de sólidos solubles totales (SST) y acidez titulable (AT)**

El contenido de SST incrementó a medida que transcurrió el almacenamiento en todos los tratamientos (Tabla 14). No obstante, los frutos con el tratamiento de 5 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> presentaron el menor incremento en el contenido de SST, seguido por los frutos tratados con 1 mg L<sup>-1</sup>, mientras que los frutos con el tratamiento de 3 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> y los frutos control presentaron el mayor incremento en el contenido de SST. Al transferir los frutos a 20 °C, todos incrementaron su contenido de SST independientemente del tratamiento, lo cual nos indicó que siguieron un proceso normal de maduración. En cuanto a la acidez titulable, durante el almacenamiento se observa un ligero incremento en todos los tratamientos, no presentando diferencias significativas entre ellos (Tabla 14). Mercado-Silva *et al.*, (1998) observaron también incrementos de SST durante el proceso normal de maduración de frutos de guayaba 'Media China' de la temporada primavera-verano, mientras que en los frutos de la temporada otoño-invierno, la acidez titulable fue mayor y se mantiene durante las diferentes etapas de maduración. El incremento observado en el contenido de sólidos solubles totales es característico de un fruto climatérico (Singh *et al.*, 2014).

**Tabla 14.** Cambios en el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable (AT) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

| TRAT                | Periodo de almacenamiento (días) |                    |                    |                     |                     |                    |                    |                    |                    |                    |
|---------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                     | SST                              |                    |                    |                     |                     | AT                 |                    |                    |                    |                    |
|                     | 0                                | 5                  | 10                 | 15                  | 15+5TA              | 0                  | 5                  | 10                 | 15                 | 15+5TA             |
| Control             | 8.81 <sup>a</sup>                | 9.19 <sup>a</sup>  | 10.00 <sup>a</sup> | 10.50 <sup>a</sup>  | 10.86 <sup>a</sup>  | 0.84 <sup>b</sup>  | 0.89 <sup>b</sup>  | 0.87 <sup>b</sup>  | 0.94 <sup>b</sup>  | 0.97 <sup>a</sup>  |
| 1 mgL <sup>-1</sup> | 7.33 <sup>ab</sup>               | 9.58 <sup>ab</sup> | 9.92 <sup>ab</sup> | 10.00 <sup>ab</sup> | 11.08 <sup>ab</sup> | 0.85 <sup>a</sup>  | 1.00 <sup>a</sup>  | 1.07 <sup>a</sup>  | 0.97 <sup>a</sup>  | 0.86 <sup>b</sup>  |
| 3 mgL <sup>-1</sup> | 7.92 <sup>a</sup>                | 9.67 <sup>a</sup>  | 10.13 <sup>a</sup> | 10.33 <sup>a</sup>  | 11.08 <sup>a</sup>  | 0.84 <sup>a</sup>  | 0.92 <sup>a</sup>  | 1.02 <sup>a</sup>  | 0.98 <sup>a</sup>  | 0.89 <sup>ab</sup> |
| 5 mgL <sup>-1</sup> | 7.75 <sup>b</sup>                | 9.00 <sup>b</sup>  | 9.17 <sup>b</sup>  | 9.92 <sup>b</sup>   | 10.92 <sup>b</sup>  | 0.85 <sup>ab</sup> | 0.92 <sup>ab</sup> | 0.97 <sup>ab</sup> | 0.97 <sup>ab</sup> | 0.89 <sup>ab</sup> |

<sup>a</sup>Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

### 7.5.5 Cambios en el índice de madurez (RPI)

El RPI disminuyó a medida que transcurrió el almacenamiento en todos los frutos tratados. No obstante, los frutos tratados con 1 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> presentaron el mayor valor de RPI, seguido de los frutos con tratamiento de 5 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, mientras que los frutos tratados con 3 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> y los frutos control presentaron el menor valor de RPI. A 20 °C, los frutos control y los tratamientos con Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> no presentaron diferencias significativas (Tabla 15). Estos resultados demuestran que los tratamientos con 1 y 5 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> retrasaron la maduración de los frutos a temperatura de refrigeración y que al ser transferidos a temperatura ambiente todos siguieron un proceso normal de maduración. Pezzarossa *et al.*, (2012) también señalaron que frutos de durazno y pera tratados con 1 mg L<sup>-1</sup> de Se retrasaron la maduración y mantuvieron la firmeza.

**Tabla 15.** Cambios en el índice de madurez (RPI) de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

| Tratamiento         | Período de almacenamiento |                   |                   |                   |                  |
|---------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
|                     | RPI                       |                   |                   |                   |                  |
|                     | 0                         | 5                 | 10                | 15                | 15+5TA           |
| Control             | 6.4 <sup>c</sup>          | 6.0 <sup>c</sup>  | 5.1 <sup>c</sup>  | 5.2 <sup>c</sup>  | 4.5 <sup>a</sup> |
| 1 mgL <sup>-1</sup> | 7.0 <sup>a</sup>          | 6.5 <sup>a</sup>  | 6.6 <sup>a</sup>  | 5.8 <sup>a</sup>  | 4.6 <sup>a</sup> |
| 3 mgL <sup>-1</sup> | 6.4 <sup>bc</sup>         | 6.1 <sup>bc</sup> | 5.9 <sup>bc</sup> | 5.6 <sup>bc</sup> | 4.4 <sup>a</sup> |
| 5 mgL <sup>-1</sup> | 6.7 <sup>b</sup>          | 6.2 <sup>b</sup>  | 6.0 <sup>b</sup>  | 5.6 <sup>b</sup>  | 4.3 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

## 7.5.6 Efecto de los tratamientos en la actividad de enzimas relacionadas con la integridad de la membrana celular

### 7.5.6.1 Cambios en la actividad de Lipoxigenasa (LOX)

La actividad de la enzima LOX presentó variaciones durante el almacenamiento en todos los frutos tratados, no observándose diferencias significativas entre ellos (Tabla 16) aunque con fluctuaciones hacia arriba y hacia abajo, las muestras de los tratamientos con selenio tendieron a mostrar valores más altos de actividad respecto de los frutos control hasta los 15 días de almacenamiento. Estos resultados coinciden con lo reportado por Martins-Silva *et al.*, (2018) quienes señalaron que las aplicaciones de Se en cultivos de garbanzo, las concentraciones por arriba de 50 g ha<sup>-1</sup> indujeron una mayor peroxidación de lípidos. También estos resultados coinciden con lo observado por Ríos *et al.*, (2009) en plantas de lechuga *Lactuca sativa* L. cv 'Philipus', donde se observó que la aplicación de dosis elevadas de selenio (80-120 µM) incrementa la actividad de LOX y con ello la peroxidación de los lípidos de la membrana (Ríos *et al.*, 2009).

**Tabla 16.** Cambios en la actividad de LOX en frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

| Tratamiento                | Periodo de almacenamiento (días)                                |                        |                        |                        |                        |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                            | μmol hidroperóxidos min <sup>-1</sup> kg proteína <sup>-1</sup> |                        |                        |                        |                        |
|                            | 0                                                               | 5                      | 10                     | 15                     | 15+5TA                 |
| <b>Control</b>             | 1.01±0.1 <sup>Ba</sup>                                          | 1.36±0.2 <sup>Aa</sup> | 0.88±0.1 <sup>Ba</sup> | 1.19±0.3 <sup>Aa</sup> | 1.21±0.1 <sup>Ba</sup> |
| <b>1 mg L<sup>-1</sup></b> | 1.11±0.1 <sup>Ba</sup>                                          | 1.47±0.1 <sup>Aa</sup> | 1.06±0.1 <sup>Ba</sup> | 1.42±0.2 <sup>Aa</sup> | 0.87±0.1 <sup>Ba</sup> |
| <b>3 mg L<sup>-1</sup></b> | 1.08±0.1 <sup>Ba</sup>                                          | 1.47±0.2 <sup>Aa</sup> | 1.05±0.1 <sup>Ba</sup> | 1.38±0.2 <sup>Aa</sup> | 1.09±0.2 <sup>Ba</sup> |
| <b>5 mg L<sup>-1</sup></b> | 1.09±0.1 <sup>Ba</sup>                                          | 1.49±0.2 <sup>Aa</sup> | 1.02±0.1 <sup>Ba</sup> | 1.21±0.2 <sup>Aa</sup> | 1.06±0.3 <sup>Ba</sup> |

<sup>A</sup>Valores con la misma letra mayúscula en la misma fila son estadísticamente iguales (p≤0.05)

<sup>a</sup>Valores con la misma letra minúscula en la misma fila son estadísticamente iguales (p≤0.05)

#### 7.5.6.2 Cambios en el contenido de Malondialdehído (MDA)

Consecuente con la actividad de la LOX, el contenido de MDA incrementó durante el almacenamiento en todos los frutos tratados. Siendo especialmente notorio la producción de este metabolito en los frutos transferidos a 20 °C. De manera interesante, los frutos tratados a 5 mg L<sup>-1</sup> mostraron un menor incremento en la producción de este metabolito (14.62 mmol g<sup>-1</sup>), respecto de los tratados con 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> y frutos control (Tabla 17). Martins-Silva *et al.*, (2018) observaron una notable producción de MDA que estuvo asociada a la dosis de Se aplicada al cultivo de garbanzo, dosis por arriba de 50 g ha<sup>-1</sup> indujeron mayores actividades de lipoxigenasa y mayor producción de MDA. Estos autores añaden que los efectos negativos del Se están asociados a una disminución en los diámetros del floema y al menor espesor del parénquima en empalizada de las hojas de la planta. Estos efectos en la estructura se adicionan a los efectos moleculares en la síntesis de etileno. No obstante, la comparación con los frutos control los datos de MDA son similares con los frutos tratados a 1 y 3 mgL<sup>-1</sup>. Nuestros resultados sugieren que las altas concentraciones de selenio al retrasar el metabolismo del fruto, podría disminuir la peroxidación de los lípidos de la membrana, no obstante, esto no correlaciona con lo observado en las propiedades mecánicas de los frutos

con dichos tratamientos. Un comportamiento similar fue observado en frutos de guayaba de la variedad 'L-49' y 'Hisar Safeda', en su proceso normal de maduración donde se observó un incremento en el contenido de MDA conforme avanzaba su maduración, siendo la variedad de 'Hisar Safeda' la que presentó el mayor contenido de MDA y los menores valores de firmeza (Mondal *et al.*, 2009). De manera interesante, en otros modelos de plantas como lechuga y centeno, la aplicación de selenio incrementa el contenido de MDA, y lo han asociado con una mayor peroxidación de los lípidos de la membrana (Cartes *et al.*, 2005; Ríos *et al.*, 2009).

**Tabla 17.** Cambios en el contenido de MDA en frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

| Tratamiento                | Periodo de almacenamiento (días)                                |                         |                          |                          |                         |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                            | μmol hidroperóxidos min <sup>-1</sup> kg proteína <sup>-1</sup> |                         |                          |                          |                         |
|                            | 0                                                               | 5                       | 10                       | 15                       | 15+5TA                  |
| <b>Control</b>             | 10.19±1.5 <sup>Bab</sup>                                        | 9.73±2.9 <sup>Bab</sup> | 10.58±1.7 <sup>Bab</sup> | 11.61±1.2 <sup>Bab</sup> | 21.43±2.1 <sup>Aa</sup> |
| <b>1 mg L<sup>-1</sup></b> | 10.78±1.5 <sup>Ba</sup>                                         | 12.55±2.0 <sup>Ba</sup> | 12.49±0.2 <sup>Ba</sup>  | 12.20±0.6 <sup>Ba</sup>  | 21.15±1.5 <sup>Aa</sup> |
| <b>3 mg L<sup>-1</sup></b> | 11.31±1.1 <sup>Ba</sup>                                         | 12.16±3.3 <sup>Ba</sup> | 12.97±0.8 <sup>Ba</sup>  | 12.40±1.5 <sup>Ba</sup>  | 22.16±3.3 <sup>Aa</sup> |
| <b>5 mg L<sup>-1</sup></b> | 9.81±0.8 <sup>Bb</sup>                                          | 10.51±0.9 <sup>Bb</sup> | 12.06±2.1 <sup>Bb</sup>  | 12.14±1.9 <sup>Bb</sup>  | 14.62±1.5 <sup>Ab</sup> |

<sup>A</sup>Valores con la misma letra mayúscula en la misma fila son estadísticamente iguales (p≤0.05)

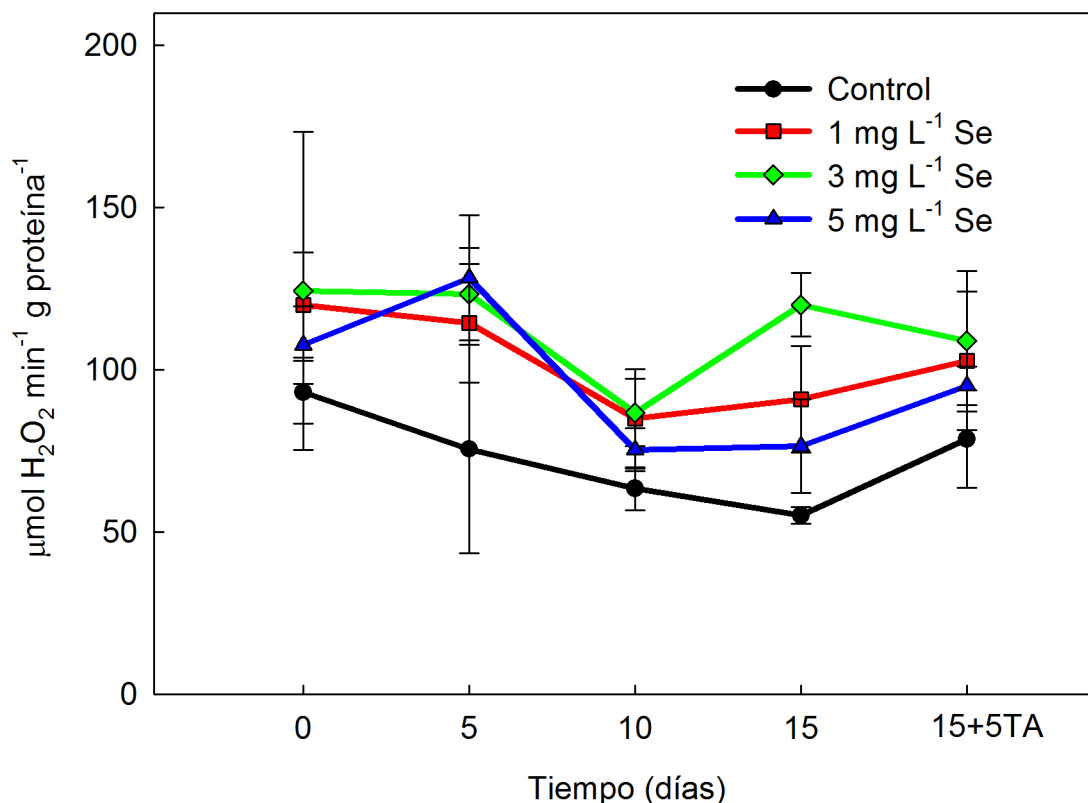
<sup>a</sup>Valores con la misma letra minúscula en la misma fila son estadísticamente iguales (p≤0.05)

## 7.5.7 Cambios en las actividades de enzimas antioxidantes

### 7.5.7.1 Actividad de catalasa (CAT)

La determinación de la actividad de estas enzimas son idicadoras del estrés oxidativo de los tejidos en estudio. La actividad de CAT disminuyó ligeramente durante el almacenamiento en todos los frutos tratados, siendo los frutos con tratamientos con selenio los que presentaron la mayor actividad respecto de los frutos control (Figura 43). Martins-Silva *et al.*, (2018) también observaron

actividades mayores de esta enzima en plantas de garbanzo que estuvieron relacionadas con la concentración de Se aplicado hasta una concentración de 100 mg ha<sup>-1</sup> y una disminución de esta actividad con aplicaciones de 1600 mg ha<sup>-1</sup>; dicho comportamiento es similar al observado en este trabajo para aplicaciones de 5 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 43.** Actividad de CAT de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> almacenados 15 días a 10 °C y 5 días a 20 °C.

El incremento observado en la actividad de CAT en los frutos con tratamientos con selenio podría indicar una respuesta al estrés oxidativo que genera peróxido de hidrogeno induciendo el incremento en la actividad de esta enzima y de esta manera proporcionando una defensa para ese tipo de estrés provocando un menor daño en la membrana celular (Puccinelli *et al.*, 2017).

De manera interesante, este trabajo muestra datos que señalan una relación positiva de los tratamientos de selenato con una mayor resistencia mecánica de la fruta. Una mayor carga máxima fue observada en frutos tratados con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  y una menor pérdida de integridad de la membrana probablemente explicada por una mayor actividad de CAT. Un comportamiento similar fue observado en frutos de tomate saladette 'Toro', donde la concentración de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  incrementó la actividad de CAT y también presentó la mayor firmeza (Castillo-Godina *et al.*, 2016).

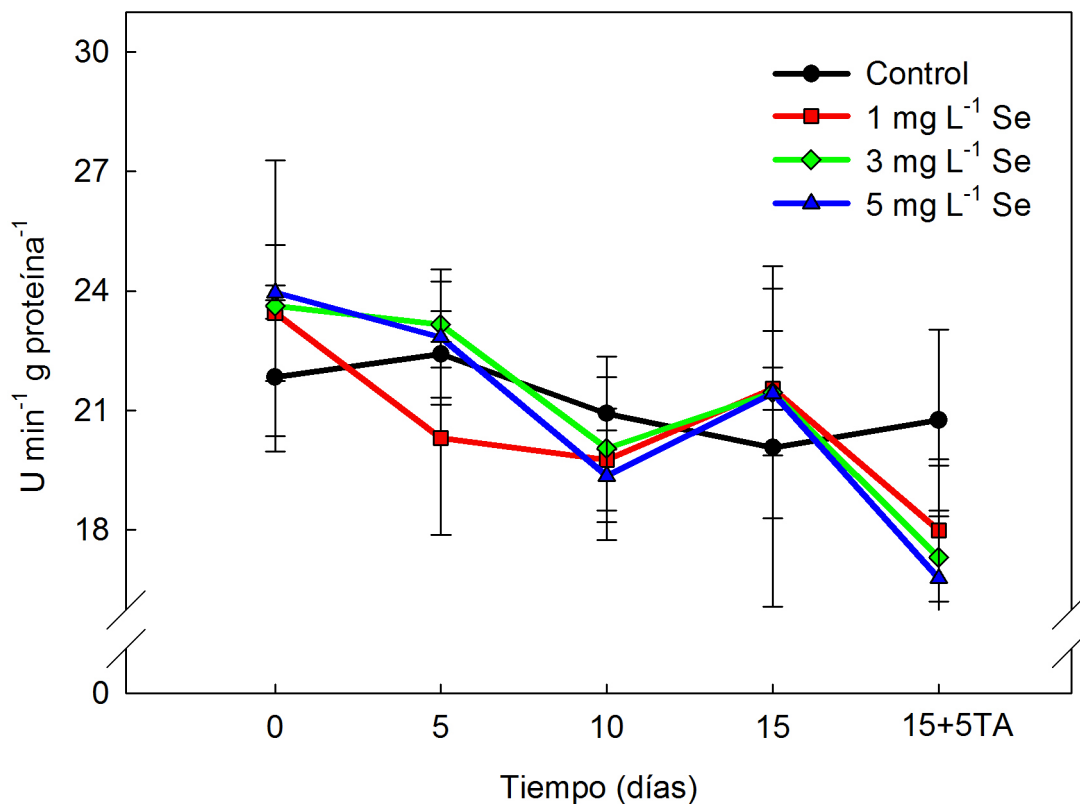
Estos datos sugieren la necesidad de realizar más investigación para esclarecer el mecanismo por el cual el Se incide en el mantenimiento de la firmeza de los frutos aún cuando se induce un estrés oxidativo podría dañar la integridad de la membrana celular.

#### **7.5.7.2 Cambios en la actividad de superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad de la enzima SOD también disminuyó durante el almacenamiento en todos los tratamientos aplicados (Figura 44), no presentando diferencias significativas entre ellos. La disminución de esta actividad, también fue observada durante el proceso de maduración a temperatura ambiente de frutos de guayaba de la variedad 'L-49' y 'Banarsi Surkha' (Ram, 2007).

Martins-Silva *et al.*, (2018) no observaron cambios significativos en la actividad de esta enzima en plantas de garbanzo cuando las dosis de Se aplicadas se encontraban en el rango de  $100$  a  $800 \text{ g ha}^{-1}$  pero dosis mayores de  $1200$  o  $1600 \text{ g ha}^{-1}$  induce una mayor actividad. Algunos autores han señalado que las altas actividades de CAT disminuyen la presencia de peróxido de hidrógeno inhibiendo la síntesis de SOD (Martins-Silva *et al.*, 2018), de acuerdo con esto, el estrés oxidativo de los frutos estaría siendo controlado por las mayores actividades de CAT. No obstante, también se ha señalado que la presencia de Se impacta negativamente la actividad de esta enzima (Hartikainen *et al.*, 2000), nuestros resultados sólo muestran este efecto al final del periodo de almacenamiento (Figura 44).





**Figura 44.** Cambios en la actividad de SOD de frutos de guayaba tratados en pre-cosecha con diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  almacenados 15 días a  $10\text{ }^\circ\text{C}$  y 5 días a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ .

En conjunto los resultados de este experimento demostraron que las aplicaciones de  $1\text{ mg L}^{-1}$  aplicado vía foliar indujo un retraso de 60 días en la maduración de los frutos los cuales mostraron una mayor resistencia mecánica durante su almacenamiento poscosecha. Este procedimiento podría ser utilizado en la producción comercial de guayaba donde, además de generar frutos de mejor resistencia, también podría ser utilizado para la producción de fruta fuera de temporada.

## 8. CONCLUSIONES

- El almacenamiento de frutos a 4 °C durante 3 y 4 semanas indujo daño por frío provocando pérdida de membranas, fosfolípidos y galactolípidos, que alteraron la permeabilidad y funcionalidad de las membranas celulares acelerando el ablandamiento de los frutos.
- La temperatura de 10 °C fue la mejor temperatura de almacenamiento, debido a un menor daño en la membrana celular. No obstante, también esta temperatura afectó el metabolismo de los lípidos.
- La aplicación en poscosecha de calcio mantiene la firmeza y calidad de los frutos de guayaba 'Media China'. No obstante, la técnica de compresión comúnmente utilizada no explicó el comportamiento viscoelástico de los frutos.
- La resistencia mecánica de los frutos fue mejor evaluada con una prueba de esfuerzo-relajación, que describe adecuadamente el comportamiento viscoelástico de los frutos;
- Los parámetros mecánicos carga máxima, deformación recuperable, deformación no recuperable y energía absorbida mostraron una alta correlación positiva con el índice de madurez (RPI), señalando que estos parámetros podrían ser utilizados para describir la resistencia de los frutos y que la DNR podría ser el mejor indicador de la deformación sufrida durante su compresión.
- El RPI se correlacionó de manera más eficiente con el estado de madurez y la resistencia mecánica de los frutos.
- Aunque las aplicaciones foliares de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  indujeron un mayor contenido de Ca en los tejidos de los frutos tratados, esto no mejoró la firmeza de los frutos.
- Los estudios histoquímicos mostraron que las aplicaciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  al 3 %, promueven la movilización de aglomerados de pectina al interior de la célula.

- El estudio histoquímico señaló que las mayores aplicaciones en pre-cosecha de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  presentaron una mayor formación de pectatos de calcio. No obstante, las evaluaciones no se asociaron con el incremento en la firmeza de los frutos.
- La aplicación pre-cosecha de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  retrasó la maduración de los frutos de guayaba y el proceso de maduración durante el almacenamiento poscosecha.
- Este tratamiento también mejoró la resistencia mecánica de los frutos y podría ser recomendado para su aplicación comercial
- El selenio incrementó la actividad de CAT en los frutos de guayaba. Lo cual puede representar que los frutos tratados muestran una mejor capacidad para resistir el estrés oxidativo. La actividad de SOD no presentó cambios respecto de las aplicaciones de selenio, esto parece confirmar que la actividad de CAT inhibe la síntesis de esta enzima.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abram, V., Berlec, B., Ota, A., Šentjurc, M., Blatnik, P., Ulrih, N., P. 2013. Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes. *Food Chemistry*. 139:804-813.
- Abreu, J., R., Santos, C., D., Abreu, C., M., P., Castro, E., M. 2012. Histochemistry and morphoanatomy study on guava fruit during ripening. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 32(1):179-186.
- Abu-Goukh, A-B., A., and Bashir, H., A. 2003. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chemistry*. 83: 213-218.
- Acehan, D., Malhotra, A., Xu, Y., Ren, M., Stokes, D., L., Schlame, M. 2011. Cardiolipin Affects the Supramolecular Organization of ATP Synthase in Mitochondria. *Biophysical Journal*. 100: 2184-2192.
- Adsule, R., N., and Kadam, S., S. 1995. Guava. In: Salunkhe DD, Kadam SS (eds) *Handbook of fruit science and technology*. Marcel Dekker, New York,.pp 419-434.
- Aghdam, M., S., Hassanpouraghdam, M., B., Paliyath, G., Farmani, B. 2012. The language of calcium in postharvest life of fruits, vegetables and flowers. *Scientia Horticulturae*. 144:102-115.
- Ali, Z., M., Lieng-Hong, C., Lazan, H. 2004. A comparative study on Wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*. 167:1317-327.
- Ames, B., N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol*. 8:115-118.
- Anderson, J., W. 1993. Selenium interactions in sulfur metabolism. In L.J. De Kok, ed, *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants: Regulatory, Agricultural and Enviromental Aspects*. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands. 49-60.
- Anthon, G., E., and Barrett, D., M. 2000. Colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:32-37.
- Antunes, M., A., C., and Sfakiotakis, E., M. 2008. Changes in fatty acid composition and electrolyte leakage of 'Hayward' kiwifruit during storage at different temperatures. *Food Chemistry*. 110:891-896.

- A.O.A.C. 2005. Association of official analytical chemists. Official Methods of Analysis. Virginia, p.p. 1000-1050.
- Arora, A., Sairam, R., K., Srivastava, G., C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 82:1227-1238.
- ASERCA. 1996. Estudios del mercado mundial de la guayaba. *Revista claridades agropecuarias*. 14:3-14.
- Ávalos, G., A., y Pérez-Urria, C., E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3):119-145.
- Azcárraga, R., M., del R., Jácquez, R., M., P., Bonfil, C., A., Sandoval, Z., E. 2010. Fruto. P:225-237. In: Azcárraga Rossette (1ª Ed.) *Atlas de Anatomía Vegetal*. UNAM, Cuautitlán.
- Bassetto, E., Jacomino, A., P., Pinheiro, A., L., Kluge, R., A. 2005. Delay of ripening of "Pedro Sato" guava with 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*. 35:303-308.
- Baziramakenga, R., Leroux, I., G., D., Simard, R., R. 1995. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology*. 21(9):1271-1285.
- Benito-Bautista, P. 2002. Daños por frío en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.): Respuestas fisiológicas y efecto de las atmósferas controladas sobre la composición de ácidos grasos y actividad fosfolipasa D en membranas microsomales. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Blackwell, R., D., Murray, A., J., S., Lea, P., J. 1990. Enzymes of photorespiratory carbon pathway. In: Lea PJ (ed) *Methods in plant biochemistry*. Academic, New York, pp: 129-144.
- Boss, W., F., and Im, Y., J. 2012. Phosphoinositide signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:409-429.
- Bottino, N., R., Banks, C., H., Irgolic, K., J., Micks, P., Wheeler, A., E., Zingaro, R., A. 1984. Selenium containing amino acids and proteins in marine algae. *Phytochemistry*. 2445-2452.
- Bligh, E., G., and Dyer, W., J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37:911-917.
- Bourne, C. 1966. Measure of shear and compression components of puncture test. *Journal of Food Science*. 31:282-291.

- 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(1-2):248-254.
- Broadley, M., R., White, M., P., J., Bryson, R., J., Meacham, M., C., Bowen, H., C., Johnson, S., E., Hawkesford, M., J., McGrath, S., P., Zhao, F., J., Breward, N., Harriman, M., Tucker, M. 2006. Biofortification of UK foodcrops with selenium. *Proceedings of Nutrition Society*. 65:169-181.
- Brown, T., A., and Shrift, A. 1980. Identification of selenocysteine in the proteins of selenite grown *Vigna Radiata*. *Plant Physiology*. 66:758-761.
- Brummell, D., A, and Harpster, M., H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*. 47:311-340.
- Carabalí, M., I., L., Narváez, C., C., E., Restrepo, S., I., P. 2009. Extracción y medida de pectin metil esterase en pitaya amarilla (*Acanthosereus Pitahaya*), enzima relacionada con el ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana*. 14(2):73-82.
- Carpita, N., and McCann, M. 2000. The cell wall. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan, Grisseem and Jones, eds.). Rockville, M.D.: Am. Soc. Plant Physiol. 52-108.
- Cartes, P., Gianfrera, L., Mora, M., L. 2005. Uptake of selenium and its antioxidative activity in ryegrass when applied a selenate and selenite forms. *Plant Soil*. 276:359-367.
- Castañeda, P., and Pérez, L., M. 1996. Calcium ions promote the response of citrus lemon against fungal elicitors or wounding. *Phytochemistry*. 42:595-598.
- Castillo-Godina, R., G., Foroughbakhch-Pournavab, R., and Benavides-Mendoza, A. 2016. Effect of selenium on elemental concentration and antioxidant enzymatic activity of tomato plants. *J. Agr. Sci. Tech*. 18: 233-244.
- Changfeng, Z., and Shiping, T. 2009. Crucial contribution of membrane lipids' unsaturation to acquisition of chilling-tolerance in peach fruit stored at 0 °C. *Food Chemistry*. 115:405-411.
- Cheng-Chang, L., and Ching-Hua, T. 2013. Slight free falling impact test for assessing guava maturity. *Agricultural Science*. 4:21-27.
- Chia-Yun, L., and Mei-Chin, Y. 2012. Renal Protective Effects of Extracts from Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) in Diabetic Mice. *Plants Food for Human Nutrition*. 67(3):303-308.

- Christensen, S., H. 1986. En *Food Hydrocolloids, vol III* Ed. M. Glicksman, CRC Press, Boca Raton, Fl. 206-227.
- Clermot, H., and Douce, R. 1970. Localization de l'active phospholipasique dans les tissus vegetaux. *FEBS letters*. 9(5):284-286.
- Combs, G., F., J. 2001. Selenium in Global Food Systems. *Brit. J. Nutr.* 85:17-547.
- Conway, W., S., Sams, C., E., Watada, A., E. 1995. Relationship between total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressureinfiltration of calcium chloride. *Acta Horticulturae*. 398:31-39.
- Cortés, V., Ortiz, C., Aleixosc, N., Blascod, J., Cuberod, S., Talensa, P. 2016. A new internal quality index for mango and its prediction by external visible and near-infrared reflection spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. 118:148-158.
- Cosgrove, D., J. 1998. Cell walls: structure, biogenesis, and expansion. In *Plant Physiology* (Taiz, L. and Zeiger, E., eds.). Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts. 409-443.
- Cosgrove, D., J. 1993. Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytology*. 124:1-23.
- Costell, E., Fiszman, M., y Durán, L. 1997. Propiedades Físicas. Geología de Sólidos y textura, pp. 242 – 243, En: *Temas de Tecnología de Alimentos*. Ed. por José Miguel Aguilera, Cyte. IPN, México.
- Crisosto, C., H., and Mitchell, F., G. 2007. Factores precosecha que afectan la calidad de frutas y hortalizas. In *Tecnología Poscosecha de Productos Hortofrutícolas*. 3a edición. Kader, A. (Ed.). University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, California, USA. 55-62.
- Cybulska, J., A., Zdunek, K., M., Psonka-Antonczyk, B., Stokke, T. 2013. The relation of apple texture with cell wall nanostructure studied using an atomic force microscope. *Carbohydrate Polymers*. 92:128-137.
- Da Costa Raposo, P., T., and Finardi-Flho, F. 2005. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza Bancroft.*). *Food Chemistry*. 89:85-92.
- Djanaguiraman, M., Durga, Devi, D., Shanker, A., K., Annie, Sheeba, J., Bangarusamy, U. 2005. Selenium-an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil*. 272:77-86.

- Djanaguiraman, M., Prasad, P., V., V., Seppanen, M. 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol. Biochem.* 48:999-1007.
- Dubots, E., Audry, M., Yamaryo, Y., Bastien, O., Ohta, H., Breton, Ch., Marechal, E., and Block, M., A. 2010. Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic Acid and phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 285 (9):6003-6011.
- Dubots, E., Botté, C., Boudière, L., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Maréchal, E., Block, M., A. 2012. Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie.* 94(1):86-93.
- Dyer, J., H., Ryu, S., B., Wang, X. 1994. Multiple forms of fosfolipase D following germination and during leaf development of castor vean. *Plan Physiological.* 105:715-724.
- Douglas, T., J., and Walker, R., R. 1984. Phospholipid, freesterol and adenosine triphosphate of the plasma membrane-enriched preparations from roots of citrus genotypes differing in chloride exclusión ability. *Physiological Plant.* 62:51-58.
- Erincik, O., L., V., Madden, L., V., Scheerens, J., C., Ellis, M., A. 1998. Evaluation of foliar applications of calcium chloride for control of Botrytis fruit rot on strawberry and effects on strawberry fruit quality. *Adv. Straw. Res.* 17:7-17.
- Espinoza-Zamora, J. 2008. Efecto de la aplicación de ceras superficiales y de 1-MCP en el perfil de aroma de frutos de guayaba cv. "Media China". Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Fakhouri, F., M., and Grosso, C. 2003. Efeito de coberturas comestíveis na vida útil de goiabas *innatura* (*Psidium guajava* L.) mantidas sob refrigeração. *Brazilian Journal of Food Technology.* 6(2):203-211.
- Feng, R., W., Wei, C., Y., Tu, S., X. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.* 87:58-68.
- Ferguson, I., B. 1984. Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant, Cell and Environment.* 7:477-48.
- Ferguson, J., B., Volz, R., K., Harker, F., R., Watkims, C., B., Brookfield, P.L. 1995. Regulation of postharvest fruit physiology by calcium. *Acta Horticulturae.* 398:23-30.



- Ferrie, B., J., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher, C., G., and Rothstein, S., J. 1994. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* 106:109-118.
- Fischer, L., R., and Bennett, A., B. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 675-703.
- Fry, S., C. 1988. The growing plant cell wall chemical and metabolic analysis (Wiley J. & Sons, eds.). New York. 332.
- Fry, S., C. 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 46:497-520.
- Gallo, F. 1996. Manual de fisiología, patología postcosecha y control de calidad de frutas y hortalizas. Armenia Quindío: Convenio Sena - Reino Unido.
- Galvis, J., A., Arjona, H., Fischer, G. 2003. Efectos de la aplicación de soluciones de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) sobre la vida de almacenamiento y la calidad del fruto de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Van Dyke. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el caribe, España y Portugal (Redalyc).* 21:190-197.
- García-Velasco, M., A. 1997. Papel del etileno exógeno en la maduración de guayaba (*Psidium guajava* L.) cv. Media China. Tesis de Licenciatura en Químico de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., Somerville, C. 1994. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast  $\omega$ -3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology.* 106:1615-1621.
- Gilroy, S., Read, N., D., Trewavas, A., J. 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature.* 346:769-771.
- Gilroy, S., Fricker, M., D., Read, N., D., Trewavas, A., J. 1991. Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. *The Plant Cell.* 3:333-344.
- Gladys-Castellano, Quijada-Osmar, Ramírez-Raúl, Sayago-Ender. 2005. Comportamiento pos cosecha de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) tratados con cloruro de calcio y agua caliente a dos temperaturas de almacenamiento. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.* 6(2):78-82.
- González de la Vara, L., and Medina, G. 1988. Effects of organic phosphate on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from red beet (*Beta vulgaris* L.). *Physiol. Plant.* 86:407-413.

- González, G., E., Padilla, R., S., Reyes, M., L., Perales de la Cruz, M., A., Esquivel, V., F. 2002. Taxonomía, morfología, adaptación y composición del fruto. Guayaba su cultivo en México. Libro Técnico No. 1. INIFAP, Campo Experimental Pabellón Aguascalientes México. 43-47, 182p.
- Gopi, K., A., and Hari, B., K. 2002. Effect of post harvest of calcium and virosil on ripening and shelf life of guava var Allahabad Safeda. The Madras Agricultural Journal. 89(4-6):221-224.
- Gorinstein, S., M., Zemser, R., Haruenkit, R., Chuthakorn, F., Grauer, O., Martin-Belloso, S. Trakhtenberg. 1999. Comparative content of polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. Journal of Nutritional Biochemistry. 10:367-371.
- Groot, H., Rauen, U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. Fundam Clin Pharma. 3:249-55.
- Guillermo, R., H. 2007. Degradación de pared celular en frutillas. Análisis de sus componentes, evaluación de la actividad enzimática y expresión de genes asociados. Tesis de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología. Universidad Nacional de General San Martín.
- Hartikainen, H., Xue, T., L., Piironen, V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. Plant and soil. 225: 193-200.
- Hasanuzzaman, M., and Fujita, M. 2011. Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. Biological Trace Element Research. 143:1758-1776.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M., A., Fujita, M. 2011. Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. Biol. Trace Elem. Res. 143:1704-1721.
- Harwood, J., L. 1997. Plant lipid metabolism. In: Plant biochemistry. Dey P.M. and J.B. Harbone. Ed. Academic Press. New York.
- Hawrylak-Nowak, B., Matraszek, R., Szymanska, M. 2010. Selenium modifies the effect of short-term chilling stress on cucumber plants. Biological Trace Element Research. 138: 307-315.
- Heath, R., L., and Pecker, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochim. Biophys. 125:189-198.

- Hirschi, K. 2001. Vacuolar H<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup> transport: who's directing the traffic? Trends in Plant Science. 6:100-104.
- Hirschi, K. 2004. The Calcium Conundrum. Both Versatile Nutrient and Specific Signal. Plant Physiology. 136:2438-2442.
- Hong, K., Jianghui, X., Lubin, Z., Dequan, S., Deqiang, G. 2012. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. Scientia Horticulturae. 144:172-178.
- Hong, Y., Zhaoa, J., Guo, L., Kimb, S., Ch., Deng, X., Wang, G., Zhang, G., Li, M., Wang, X. 2016. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. Progress in Lipid Research. 62:55-74.
- Hours, R., A., Ferreyra, M., M., Schvab, M., C., Gerard, L., M., Zapata L., M., Davies, C., V. 2005. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de jugos de naranja destinados a vinificación. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 31:219-239.
- Hsiao, T., C., and Liu-Kang. 2000. Sensivity of growth of roots versus leaves to wáter stress: biophysical analysis and relation to wáter transport. Journal of experimental Botany. 51(350):1595-1616.
- INEGI, 2001. Anuario Estadístico, Michoacán de Ocampo. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, Aguascalientes.
- Jang, J., H., Leeb, C., S., Hwanga, D., Ryu, S., H. 2012. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. Progress in Lipid Research. 51:71-81.
- Jiménez, A., Cressen, G., Kular, B., Firmin, J., Ronbinson, S., Verhoeyen, M. 2002. Changes in oxidative process and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. Planta. 214:751-758.
- Johansen, D., A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill. New York.
- Kader, A., A., and Saltveit, M., E. 2003. Respiration and gas exchange. p.7-23. In: Bartz J. A. and J. K. Brecht. (eds). Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables (2nd ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Kader A.A. 1999. Guava. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. [http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity\\_Resources/Fact\\_Sheets/Datastores/Frit\\_S](http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Frit_S). (Accessed January 18, 2016).

- Kader, A., A. 2002. Postharvest biology and technology: an overview. p.39-47. In: Kader A. A. (ed.). Postharvest Technology of Horticultural Crops (3rd ed.). University of California, Agriculture & Natural Resources, Publication #3311.
- Kanjuna, S., T., A., Bilanski, W., K., Mittal, G., S. 1998. Effect of ripening on the parameters of three stress relaxation models for banana and plantain. American Society of Agricultural Engineers. 14(1):55-61.
- Karp, G. 2010. Biología molecular y celular (Conceptos y experimentos). In: Karp.G. (6ª Ed.). La estructura y función de la membrana plasmática. Ma Graw Hill. pp.117-170.
- Kato, T., K., Tanaka, K., and Shibata, D. 1992. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. Plant Physiol. 98: 324-330.
- Kays, S., J. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products. An Avi Book 1<sup>st</sup> Ed. New York, USA.
- Kays, S., J., and Paull, R., E. 2004. Postharvest Biology. Exon Press, USA. pp.568.
- Kittemann, D., Neuwald, D., A., and Streif, J. 2010. Influence of calcium on fruit firmness and cell wall degrading enzyme activity in 'Elstar' apples during storage. Acta Horticulturae. 877:1037-1043.
- Knee, M., and Bartley, J., M. 1981. Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. In Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables (Friend, J. and Rhodes, M.J.C. eds.). London Academic. 133-148.
- Kumar, R., Kotur, S., C., Singh, H., P. 1996. Response of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda to potassium on a sandy loam soil. Journal of Potassium Research. 12:59-64.
- Kumar, M., Bijo, A., J., Baghel, R., S., Reddy, C., R., K., Jha, B. 2012. Selenium and Spermine alleviates cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidant system and DNA methylation. Plant Physiol. Biochem. 51: 129-138.
- Kruger, N., J. 2002. The Bradford method for protein quantitation. Part I. The protein protocols Handbook, 2<sup>nd</sup> edition . Humana Press Inc Totawa, N.J. 15-21.

- Lacan, D., and Baccou, J., C. 1996. Changes in Lipids and Electrolyte Leakage during Nonnetted Muskmelon Ripening. *Journal American Society Horticultural Science*. 121(3): 554-558.
- Lange, C, Nett, J., H., Trumpower, B., L., Hunte, C. 2001. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. *EMBO J*. 20:6591-6600.
- Lester, G., E. 1988. Comparisons of Honey Dew and netted muskmelon fruit tissues in relation to storage life. *HortScience*. 23:180-182.
- Lester, G., E. 1990. Lipoxygenase activity of hypodermal- and middle-mesocarp tissues from netted muskmelon fruit during maturation and storage. *Journal American Society Horticultural Science*. 115:612-615.
- Lester, G., and Stein, E. 1993. Plasma membrane physicochemical changes during maturation and postharvest storage of muskmelon fruit. *Journal American Horticultural Science*. 118(2):223-227.
- Li, Z., Lv, K., Wang, Y., Zhao, B., Yang, Z. 2015a. Multi-scale engineering properties of tomato fruits related to harvesting, simulation and textural evaluation. *LWT-Food Science and Technology*. 61:444-451.
- Li, Q., Zheng, Q., Shen, W., Cram, D., Fowler, D., B., Wei, Y., Zou, J. 2015b. Understanding the biochemical basis of temperature-induced lipid pathway adjustments in plants. *The Plant Cell*. 27:86-103.
- Luis, A., A., Mendoza, L., M., R., Mena, C., J. 2003 Comportamiento del guayabo en la región Oriente de Michoacán. In *Primer Simposio Internacional de la Guayaba*. Aguascalientes, México.
- Lurie, S., and Ben-Arie, R. 1983. Microsomal membrane changes during the ripening of Apple fruit. *Plant Physiological*. 73:636-638.
- Lurie, S., and Ben-Yehoshua, S. 1986. Changes in membrane properties and abscisic acid during senescence of harvested bell pepper fruit. *Journal American Society Horticultural Science*. 111:886-889.
- Lyons, J., M. 1973. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol*. 24: 445-466.
- Maalekuu, K., Tuvia-Alkalai, S., Shalom, Y., Fallik, E. 2005. Characterization of physiological and biochemical factors associated with postharvest water loss in ripe pepper fruit during storage. *Journal American Society Horticultural Science*. 130(5):735-741.

- Maalekuu, K., Elkind, Y., Leikin-Frenkel, A., Lurie, S., and Fallik, E. 2006. The relationship between water loss, lipid content, membrane integrity and LOX activity in ripe pepper fruit after storage. *Postharvest Biology and Technology*. 42:248-255.
- Mahajan, B., V., and Dhatt, A. 2004. Studies on postharvest calcium chloride application on storage behaviour and quality of Asian pear during cold storage. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 2(3):157-159.
- Mahajan, B., V., C., Ghuman, B., S., Bons, Harsimrat, K. 2011. Effect of postharvest treatments of calcium chloride and gibberellic acid on storage behaviour and quality of guava fruits. *Journal of Horticultural Ornamental Plants*. 3(1):38-42.
- Mahendran, T. 2010. Physico-chemical properties and sensory characteristics of dehydrated guava concentrate: effect of drying method and maltodextrin concentration. *Trop Agric Res Ext*. 13(2):48-54.
- Mandal, G., Dhaliwal, H., S., Mahajan, B., V., C. 2010. Effect of pre-harvest calcium sprays on post-harvest life of winter guava (*Psidium guajava* L.). *J Food Science Technology*. 47:501-506.
- Manganaris, G., A., Vasilakakis, M., Diamantidis, G., Mignani, I. 2007. The effect of postharvest calcium application on tissue calcium concentration, quality attributes, incidence of flesh browning and cell wall physicochemical aspects of peach fruits. *Food Chemistry*. 100:1385-1392.
- Mao, L., Pang, H., Wang, G., Zhu, Ch. 2007. Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biol. and Tech*. 44(1):42-47.
- Marin, R., C., Orchard, J., Seymour, G., V. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot*. 53: 2115-2119.
- Martins-Silva, V., Marcandalli-Boleta, E., H., Bereta-Lanza, M., G., D., Lavres, J., Trandade-Martins, J., Ferrera-Santos, D., Mendes dos-Santos, F., L., Ferrari-Putti, F., Furlani-Junior, E., White, P., J., Boradley, M., R., Pereira de Carvalho, H., W., Rodrigues dos-Reis, A. 2018. Physiological, biochemical, and ultrastructural characterization of selenium toxicity in cowpea plants. *Environmental and Experimental Botany*. 150:172-182.
- Maunder, M., J., Holdsworth, M., J., Slater, A., Knapp, J., E., Bird, C., R., Schuch, and Grierson D. 1987. Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell and Environmental*. 10(2):177-184.

- Mendoza, L., M., R., Luis, A., A., Castillo, O., S., F., Vidales, H., I. 2005. Diagnóstico del manejo actual del cultivo de guayaba en la región oriente de Michoacán. SAGARPA.
- Mercado-Silva, E., Benito-Bautista, P., García-Velasco, M., De los A. 1998. Fruit development, harvest index and ripening change of guavas produced in central Mexico. *Postharvest Biology and Technology*. 13(2):143-150.
- Metcalfe, L., D., Schmitz, A., A., Pelka, J., R. 1996. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. 514-515.
- Miean, K., H., and Mohamed, S. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(6):3106-3112.
- Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. 2014. Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chemistry and Physics of Lipids* 179:42-48.
- Minamide, T., Goto, M., Iwata, T. 1986. Forms of calcium compounds and their changes after harvest in fruits and vegetables. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 54: 507-513.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7(9):405-410.
- Mitra, S., K., and Bose, T., K. 1985. Effect of varying levels of nitrogen, phosphorus and potassium on yield and quality of guava (*Psidium guajava* L.) var. L-49. *South Indian Horticulture*. 33:286-292.
- Mocrief, N., R., Kretsinger, M., Goodman. 1990. Evolution of EF-hand calcium modulated proteins. In: *Relationships based on amino acid sequences*. *Journal Molecular Evolution*. 30:522-562.
- Mohsenin, N., N. 1970. Physical properties of plant and animal Materials. Vol. I. Structure, Physical Characteristics and Mechanical Properties. Gordon and Breach Science Publishers. New York. 721 p.
- Mondal, K., Malhotra S., P., Jain, V., and Singh, R. 2009. Oxidative stress and antioxidant system in Guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Physiol. Mol. Biol.* 15(4): 327-334.
- Monge, E., Val, J., Sanz, M., Blanco, A., Montañes, L. 1994. El calcio nutriente para las plantas. Bitter pit en manzano. *An. Estac. Exp. Aula Dei (Zaragoza)*. 21(3): 189-201.

- Nguyen, X., V., and Mazliak, P. 1990. Chilling injury induction is accompanied by galactolipids degradation in tomato pericarp. *Plant Physiology and Biochemistry*. 28(2):283-291.
- Nishida, I., and Murata, N. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 541-568.
- Nitin, S., U., and Vinod, V., M. 1990. Sodium selenite induced changes during ripening in post-harvest banana (*Musa sapientum*) fruits. *Biofactors*. 2(4): 263-265.
- Njoroge, K., C., Kerbel, L., E., and Briskin, D. 1998. Effect of calcium and calmodulin antagonists on ethylene biosynthesis in tomato fruits. *Journal Science Food Agriculture*. 76:209-214.
- Nowicki, M., Müller, F., Frentzen, M. 2005. Cardiolipin synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies*. 579:2161-2165.
- Ohlrogge, J., and Browse, J. 1995. Lipid biosynthesis. *The plant cell*. 7:957-970.
- Om-arun, N., Korakot, C., Wouter G., Jingtair, S. 2015. Chilling injury in pineapple fruit: Fatty acid composition and antioxidant metabolism. *Postharvest Biology and Technology*. 99:20-26.
- Ortiz, G., R. 2006. Efecto del 1-Metilciclopropeno (1-MCP) y de tipo de fertilización en la vida de anaquel y calidad de guayaba (*Psidium guajava* L.) cv. "Media China". Tesis de Maestría en Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Oteiza, P., I., Erlejman, A., G., Verstraeten, S., V., Keen, C., L., Fraga, C. G. 2005. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical & Developmental Immunology*. 12(1):19-25.
- Padilla, R., J., S., González, G., E., Valadez, M., C., C., Esquivel, V., F., Reyes, M., L. 1999. Tecnología para aumentar la productividad del guayabo en la región Calvillo-Cañones. *Publicación Especial No. 28. SAGAR-INIFAP-CIRNOC-CEPAB*. p.38.
- Paliyath, G., and Poovaiah, B., W. 1985. Calcium- and Calmodulin-Promoted phosphorylation of membrane proteins during senescence in apples. *Plant Cell Physiology*. 26(6):977-999.
- Paliyath, G., Tiwari, K., Yuan, H., Whitaker, B., D. 2008. Structural deterioration in produce: phospholipase D, membrane deterioration, and senescence. *Postharvest Biology and Technology*. 195-239.



- Palta, J., P. 1990. Stress interactions at the cellular and membrane levels. *HortScience*. 25(11):1377-1381.
- Parkin, K., L., Marangoni, A., Jakman J., L., Yada, R., Y., Stanley, D., W. 1989. Chilling injury: A review of possible mechanisms. *Journal Food Biochemistry*. 13:127-153.
- Paull, R., E. 1990. Chilling Injury of crops tropical and subtropical origin. In *Chilling Injury of Horticultural crops* (Wang, Ed.) CRC, Press, Inc. Boca Ratón Fl. USA.
- Peryea, F., J., and Neilsen, G., H. 2006. Effect of very high calcium sprays just before harvest on apple tree fruit firmness and calcium concentration. *Acta Hortic*. 721:199-206.
- Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L., J., Bastien, O., Rébeillé, F., Jouhet, J., Falconet, D., Block, M., A., McFadden, G., I., Bowler, Ch., Botté, C., Maréchal, E. 2014. Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways-From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research*. 54:68-85.
- Pezzarossa, B., Rosellini, I., Borghesi, E., Tonutti, P., Malorgio, F. 2014. Effects of Se-enrichment on yield, fruit composition and ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants grown in hydroponics. *Scientia Horticulturae*. 65:106-110.
- Pezzarossa, B., Malorgio, F., and Tonutti, P. 1999. Effects of selenium uptake by tomato plants on senescence, fruit ripening and ethylene evolution. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II*. 275-276.
- Pezzarossa, B., Remorini, D., Gentile, M., L., Massai, R. 2012. Effects of foliar and fruit addition of sodium selenate on selenium accumulation and fruit quality. *J. Sci. Food Agric*. 92:781-786.
- Picchioni, G., A., Watada, A., E., Conway, W., S., Whitaker, B., D., Sams, C., E. 1998. Postharvest Calcium Infiltration Delays Membrane Lipid Catabolism in Apple Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:2452-2457.
- Pineau, B., Bourge, M., Marion, J., Mauve, C., Gilard, F., Maneta-Peyret, L., Morea, P., Satiat-Jeunemaître, B., Brown, S., C., De Paepe, R., Danon, A., 2013. The importance of cardiolipin synthase for mitochondrial ultrastructure, respiratory function, plant development, and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25:4195-4208.

- Pinhero, R., G., Paliyath, G., Yada, R., Y., Murr, D., P. 1998. Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol and Biochemistry*. 36(3):213-224.
- Pinhero, R., G., Almquist, K., C., Novotna, Z., Paliyath, G. 2003. Developmental regulation of phospholipase D in tomato fruits. *Plant Physiol. Biochem.* 41:223-240.
- Pinheiro, S., S., C. 2006. Qualidade das goiabas ensacadas e manejadas com diferentes productos fitossanitários, sob manejo organico. Doctorate Thesis, Universidade Federal de Vicosa.
- Pommer, C., V., and Murakami, K., R., N. 2009. Breeding guava (*Psidium guajava* L.): in Jain S. M. and Priyadarshan P. M. *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. New York, Springer. 83-120.
- Posé, S., Kirby, A., R., Paniagua, C., Waldron, K., W., Morris, V., J., Quesada, M., A., Mercado, J., A. 2015. The nanostructural characterization of strawberry pectins in pectate lyase or polygalacturonase silenced fruits elucidates their role in softening. *Carbohydrate Polymers*.
- Prado, R., M., Natale, W., Alberto da Silva, J., A. 2005. Liming and quality of guava fruit cultivated in Brazil. *Scientia Horticulturae*. 106:91-102.
- Puccinelli, M., Malorgio, F., and Pezzarossa, B. 2017. Selenium Enrichment of Horticultural Crops. *Molecules*. 22(933):1-18.
- Pukacka, S., Ratajczak, E., Kalembe, E. 2011. The protective role of selenium in recalcitrant *Acer saccharium* L. seeds subjected to desiccation. *J. Plant Physiol*. 168:220-225.
- Raison, J., K., and Orr, G., R. 1990. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury, p. 145–164. In: C.Y. Wang (ed.). *Chilling injury of horticultural crops*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ram, Sita. 2007. Lipid peroxidation and oxygen scavenging system in guava (*Psidium guajava* L.) fruit during ripening and storage. Tesis de Maestría de Ciencias en Bioquímicas. Universidad de Agricultura Haryana India.
- Rayman, M., P. 2012. Selenium and human health. *Lancet*. 379:1256-1268.
- Razzaq, K., Khan, A., S., Malik, A., U., Shahid, M. 2013. Ripening period influences fruit softening and antioxidative system of ‘Samar Bahisht Chaunsa’ mango. *Scientia Horticulturae*. 160:108-114.

- Ren, M., Phoon, C., K., L., Schlame, M., 2014. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Progress in Lipid Research*. 55:1-16.
- Revilla, G., y Zarra, I. 2000. La fisiología vegetal y su impacto social. La célula vegetal. p. 1-16. In: *Fundamentos de fisiología vegetal*. Azcón-Bieto Joaquín, Talón Manuel. McGRAW-HILL Interamericana.
- Ridley, B., L., O'Neill, M., A., Mohnen, D. 2001. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57:929-967.
- Ríos, J.,J., Blasco, B., Cervilla, L.,M., Rosales, M.,A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L., Ruiz, J.,M. 2009. Production and detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in lettuce plants exposed to selenium *Annals of Applied Biology*. 154:107-116.
- Rivera-Pastrana, D., M., Gardea, A., A., Yahia, E., M., Martínez-Téllez, M., A., González-Aguilar, G., A. 2013. Effect of UV-C irradiation and low temperature storage on bioactive compounds, antioxidant enzymes and radical scavenging activity of papaya fruit. *Journal of Food Science and Technology*. 51(12):3821-3829.
- Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C. 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. 6:25-54.
- Rose, J., K., C., Catalá, C., Gonzalez-Carranza, C., Z., H., Roberts, J., A. 2003. Plant cell wall disassembly. In JKC Rose, ed, *The Plant Cell Wall*, Vol 8. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 264-324.
- Ruelland, E., Cantrel, C., Gawer, M., Kader, J., C., Zachowski, A. 2002. Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in Arabidopsis suspension cells. *Plant Physiol*. 130(2):999-1007.
- SAGARPA. 2018. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Atlas Agroalimentario. Reporte 2016. México.
- Saladié, M., Matas, A., J., T., Isaacson, M., A., Jenks, S., M., Goodwin, K., J., Niklas, R., Xiaolin, J., M., Labavitch, K., A., Shackel, A., R., Fernie, A., Lytovchenko, M., A., O'Neill, C., B., Watkins, J., K., C., Rose. 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*. 144:1012-1028.
- Sanders D., J., Pelloux, C., Brownlee, J., F., Harper. 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*. 401-417.
- Sandoval, E. 2005. Técnicas histoquímicas. In: *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Universidad Nacional Autónoma de México. pp:119-143.

- Sanz, L., C., Pérez, A., G., Olías, J., M. 1992. La lipoxigenasa en el reino vegetal I. Propiedades. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España. 43:231-239.
- Schlame, M., Ruab, D., Greenberg, M. L. 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*. 39(3):257-288.
- Sebastia, C., H., Hardin, S., C., Clouse, S., D., Kieber, J., J., Huber, S., C. 2004. Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 428:81-91.
- Seymour, G., B., Fray, R., G., Hill, P., Tucker, G., A. 1993. Down-regulation of two nonhomologous endogenous tomato genes with a single chimeric sense gene constructs. *Plant Molecular Biology*. 23(1):1-9.
- Sharaf, A., and El-Saadany, S., S. 1987. Biochemical studies on guava fruits during different maturity stages. *Chemistry Microbiological Technology Lebensn.* 10:145-149.
- Sharma, S., K., and Kumar, A. 2015. Role of biomolecules in sensing, signal transducing and acclimation in plants against frost induced low temperature stress- A Review. *International Research Journal of Engineering and Technology*. 2(9):2187-2207.
- Shirur, D., S., Roshan, A., Timilsina, S., S., Sunita, S. 2013. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 3(2):162-168.
- Singh, K., and Chauhan, K., S. 1982. Effect of pre-harvest application of calcium, potassium and Alar on fruit quality and storage life of guava fruits. *Haryana Agricultural University Journal of Research*. 12:649-654.
- Singh, S., P., and Pal, R., K. 2008. Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 47:296-306.
- Singh, S., P., and Pal, R., K. 2009. Ionizing radiation treatment to improve postharvest life and maintain quality of fresh guava fruit. *Radiation Physics and Chemistry*. 78:135-140.
- Singh, K., B., Dhaliwal, H., S., and Mahajan, B., V., C. 2014. Effect of post-harvest treatment of ascorbic acid on shelf life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) Cv. Allahabad safeda. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*. 2:130-141.
- SINIIM. 2017. Sistema nacional de información e integración de mercados.

- Somerville, C., and Browse, J. 1991. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science*. 252(5002):80-7.
- Stadtman, T., C. 1990. Selenium biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 59:111-127.
- Sudheesh, S., Sandhya, C., Sarah, K., A., Vijayalakshmi, N., R. 1999. Antioxidant activity of flavonoids from *solanum melongena*. *Phytother Res.* 13:393-396.
- Suntharalingam, S. 1996. Postharvest treatments of mangoes with calcium. *Tropical Science.* 36:14-17.
- Surrey, N., K. 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxygenase activity. *Plant Physiology.* 39:65-69.
- Tasaka, Y., Nishida, I., Higashi, S., Beppu, T., Murata, N. 1990. Fatty acid composition of phosphatidylglycerols in relation to chilling sensitivity of woody plants. *Plant and Cell Physiology.* 31(4):545-550.
- Tatsuki, M., and Mori, H. 2001. Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase LE-ACS2, at the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 276:28051-28057.
- Tejagal, I., León, M., Damián, M., Hernández, R. 2005. Chilling in sapote mamey (*Pouteira sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn). II. Changes in total phenols and enzymatic activity. *Rev Fitotec Mex.* 28(1):25-32.
- Terry, N., Zayed, A., M., M., P., de Souza, Tarun, A., S. 2000. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plan Physiology. Plant Mol. Biol.* 51:401-432.
- Thompson, J., E., Froese, C., D., Madey, E., Smith, M., D., Hong, Y. 1998. Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research.* 37:119-141.
- Thole, J., M., and Nielsen, E. 2008. Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(6):620-631.
- Tucker, G., A., Seymour, G., B., Taylor, E., J. 1993 ed. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman and Hall. 454 p.
- Valdiviezo, M., L. 2012. Diseño y caracterización de microcápsulas de selenio metionina. Tesis Maestría Recursos Genéticos y Productividad en Ganadería. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, México, D.F. 70 p.

- Van Hoewyk, D. 2013. A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. *Ann. Bot.* 112: 965-972.
- Vargas, A., D., Soto, H., M., González, H., V., A., Engleman, E., M., Martinez, G., A. 2006. Kinetics of accumulation and distribution of flavonoids in guava (*Psidium guajava*). *Agrociencia.* 40:109-115.
- Varner, J., E., and Lin, L., S. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell.* 56:231-239.
- Vásquez-Caicedo, A., L., Sruamsiri, P., Carle, R., and Neidhart, S. 2005. Accumulation of all-trans- $\beta$ -carotene and its 9-cis and 13-cis stereoisomers during postharvest ripening of nine thai mango cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4827-4835.
- Verstraeten, S., V., Keen, C., L., Schmitz, H., H., Fraga, C., G., and Oteiza, P., I. 2003. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology and Medicine* 34(1):84-92.
- Von, D., M., L., Odell, D., G. Mandolil. 2001. Relationships between growth, morphology and Wall stress in the stalk of *Acetabularia acetabulum*. *Planta.* 213:659-666.
- Wade, N., L., Campbell, L., C., Bishop, D., G. 1980. Tissue permeability and membrane lipid composition of ripening banana fruits. *Journal of Experimental Botany.* 31:975-982.
- Waldron, K., W., Parker, M., L., Smith, A., C. 2003. Plant Cell Walls and Food Quality. *Food Science and Food Safety.* 2:128-146.
- Wang, C., Q. 2011. Water-stress mitigation by selenium in *Trifolium repens* L. *J. Plant Nutr.* 174:276-282.
- Wang, X. 2001. Plant phospholipases. *Annu. Rev. Plant Physiological. Plant Molecular Biology.* 52:211-231.
- Whitaker, B., D. 1994. Lipid Changes in mature-green tomatoes during ripening, during chilling, and after rewarming subsequent to chilling. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(5):994-999.
- Whitaker, B., D. 1988. Changes in the steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry.* 27(11):3411-3416.
- White, P., J., and Broadley, M., R. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany.* 92:487-511.

- Xisto, P., R., Patto de A., C., Corrêa D., A., ; Donizete D., S. 2004. Textura de goiabas 'Pedro Sato' submetidas à aplicação de cloreto de cálcio. Ciências e Agrotecnologia. 28(1):113-118.
- Xue, T., L., Hartikainen, H., Piironen, V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. Plant Soil. 237:55-61.
- Yam, Tzec, J., A., Villaseñor, Perea, C., A., Romantchik, Kriuchkova, E., Soto, Escobar, M., Peña, M., A. 2010. Una revisión sobre la importancia del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características postcosecha. 19:74-82.
- Yang, S., F., and Hoffman, N., E. 1984. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. Annual Review of Plant Physiology. 35:155-189.
- Yao, X., Q., Chu, J., Z., Ba, C., J. 2010. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. Biological Trace Element Research. 136:96-105.
- Yi, C., Qu, H., X., Jiang, Y., M., Shi, J., Duan, X., W., Joyce, D., C., and Li, Y., B. 2008. ATP-induced changes in energy status and membrane integrity of harvested litchi fruit and its relation to pathogen resistance. Journal Phytopathology. 156:365-371.
- Yong-Gui, P., Meng-Qi, Y., Wei-Min, Z., Zhengke, Z. 2017. Effect of low temperatures on chilling injury in relation to energy status in papaya fruit during storage. Postharvest biology and Technology. 125:181-187.
- Yu, H., L., and Willemont, C. 1996. Inhibition of eukaryotic galactolipid biosynthesis in mature-green tomato fruits at chilling temperature. Plant Science. 113(1):33-41.
- Yu, J., Q., Ye, F., S., Zhang, M., F., Hu, W., H. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. Biochemical Systematics and Ecology. 31:129-139.
- Yuan, H., Chen, L., Paliyath, G., Sullivan, A., and Murr, D.P. 2005. Characterization of microsomal and mitochondrial phospholipase D activities and cloning of a phospholipase D alpha cDNA from strawberry fruits. Plant Physiol. Biochem. 43:535-547.
- Yurtlu, Y., B., and Erdogan, D. 2005. Effect of Storage Time on Some Mechanical Properties and Bruise Susceptibility of Pears and Apples. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 29(6):469-482.

- Yuwana, Y., and Duprat, F. 1998. Prediction of apple bruising based on the instantaneous impact shear stress and energy absorbed. *International Agrophysics*. 12:133-140.
- Yuzawa, Y., Shimojima, M., Sato, R., Mizusawa, N., Ikeda, K., Suzuki, M., Iwai, M., Hori, K., Wada, H., Masuda, S., Ohta, H. 2014. Cyanobacterial monogalactosyldiacylglycerol-synthesis pathway is involved in normal unsaturation of galactolipids and low-temperature adaptation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1841(4): 475-483.
- Zambrano-Zaragoza, M.L., Mercado-Silva, E., Ramirez-Zamorano, P., Cornejo-Villegas, M.A., Gutiérrez-Cortez, E., Quintanar-Guerrero, D. 2013. Use of solid lipid nanoparticles (SLNs) in edible coatings to increase guava (*Psidium guajava* L.) shelf-life. *Food Research International*. 51:946-953.
- Zapata, K., Cortes, F., B., y Rojano, B., A. 2013. Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*). *Información tecnológica*. 24(5):103-112.
- Zhu, Z., Yanli, C., Guoqing, S., Xueji, Z. 2017. Selenium delays tomato fruit ripening by inhibiting ethylene biosynthesis and enhancing the antioxidant defense system. *Food Chemistry*. 219:179-184.