



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización fisiológica de frutos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) sometidos a bajas temperaturas

Nubia Marcela Orjuela Baquero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia

2012

Caracterización fisiológica de frutos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) sometidos a bajas temperaturas

Nubia Marcela Orjuela Baquero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Biología

Directora:

Dr.Sci. Luz Marina Melgarejo Muñoz

Asesora: Dr.Sci. María Soledad Hernández

Línea de Investigación:

Biodiversidad y conservación

Grupo de Investigación:

Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2012

*Dedicado a mis padres y hermanos, a quienes
les debo este logro, entre tantos otros, por su
incondicional y permanente apoyo.*

Muchas gracias por estar allí.

Adoro vocés!

Carpe diem

Agradecimientos

Agradezco a mis padres Cesar Augusto Orjuela Gómez y Margarita Baquero Medina, y a mis hermanos Diana Patricia y Cesar Alejandro por su apoyo incondicional, la facilitación para lograr las distintas etapas de esta tesis y su acompañamiento, la financiación y respaldo durante mis estudios y toda la paciencia que tuvieron para acompañarme en este camino.

A mi directora de tesis Luz Marina Melgarejo Muñoz, por su acompañamiento y asesoría, y por la confianza que ha depositado en mí a lo largo de estos años.

A la profesora María Soledad Hernández, por su asesoría durante la interpretación de los resultados y tan oportuna orientación brindada.

A las entidades financiadoras del macroproyecto “Efecto de las condiciones poscosecha sobre la fisiología, bioquímica, conservación y análisis proteómico en frutos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims)” dentro del cual se enmarcó la presente tesis: Colciencias, Universidad Nacional de Colombia, Ocati S.A.

Al programa de becas “Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Gutiérrez de Pineda” de Colciencias, convocatoria 510 de 2010, por la financiación otorgada.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, quien me apoyó durante el primer semestre de 2011 con la Beca Auxiliar Docente.

Al Laboratorio de Investigación en Fisiología y Bioquímica Vegetal del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, por la prestación de instalaciones y de equipos para el desarrollo de los análisis fisicoquímicos y bioquímicos; al Laboratorio de Poscosecha del Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI, por la facilitación de sus instalaciones y equipos para los análisis fisiológicos.

A Andrés Leonardo Moreno Chacón por su oportuna colaboración en el montaje y desarrollo de la parte experimental de esta tesis, y por los gratos momentos compartidos.

A mis queridas amigas y colegas Lucía Espitia Aguirre y Adriana Tinoco Valencia por el ánimo que siempre me impregnaban para continuar adelante, y por sus invaluable y precisos consejos. Y a Carolina y Camilo por su apoyo en estas últimas semanas.

A mis compañeros del grupo de investigación “Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos”: Seyed Mehdi Jazayeri, Nubia Farid Barrera, Carmen Tulia Potosí, Laura Victoria Pérez, Laura Marcela Flórez, Walter Hernando Pérez, Sandra Crespo, Martha Jiménez y Juan David Velázquez por el apoyo que en tan diversos aspectos y maneras me brindaron, para orientar y concretar esta investigación.

Al profesor Stanislav Magnitskiy por sus orientaciones, y amable revisión del documento de proyecto de tesis. Y al profesor Martínez por su orientación estadística.

Y finalmente a quienes estuvieron en este camino orientado mi formación como investigadora y por su apoyo incondicional para tantos otros aspectos: Luis Carlos Montenegro y Orlando Rivera.

Resumen

Considerando la necesidad de favorecer el mercado de exportación transcontinental de la gulupa (*Pasiflora edulis* Sims), se hace indispensable estudiar el uso de tecnologías poscosecha que permitan prolongar la vida posrecolección del fruto para alcanzar dichos mercados. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de las bajas temperaturas de almacenamiento sobre la fisiología de los frutos de gulupa en diferentes estados de madurez. Para lo cual se estudiaron dos estados de madurez (50% y 75% de color púrpura en cáscara) y mediante un diseño factorial completamente al azar, fueron evaluados ante los factores temperatura (4 ± 2 , 8 ± 2 y $18\pm 2^\circ\text{C}$) y empaque. Se midió la respuesta durante el almacenamiento de parámetros fisiológicos, bioquímicos y fisicoquímicos. Se encontró que las respuestas fueron semejantes entre los dos estados de madurez evaluados. Los frutos almacenados sin empaque, sufrieron daño por frío a temperatura de 4°C evidenciado en la alta tasa de pérdida de peso, y el rápido arrugamiento de la cáscara. De manera que el almacenamiento a 4°C es inadecuado, pero con el uso de atmósferas modificadas se provee un alivio al daño por frío. La alta tasa de pérdida de peso y la rápida deshidratación que afecta la apariencia del fruto pueden ser indicadores del daño por frío en frutos de gulupa. Los contenidos de azúcares y las actividades de catalasa, peroxidasa y poligalacturonasa en los frutos con 50% de madurez a 4°C en empaque Control, sugieren la susceptibilidad de estos frutos frente a las bajas temperaturas.

Palabras clave: maduración, poscosecha, almacenamiento, CAT, POD, azúcares, ácidos orgánicos

Abstract

Considering to improve the transcontinental market of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) it is necessary to study the use of postharvest technologies to increase the postharvest life of the fruit in order to reach that market. The aim of the present research was to evaluate the low temperature storage effect on purple passion fruit physiology at different ripe stages. Fruits at two ripening stages (50% and 75% purple rind) were subjected to a random factorial design to evaluate storage temperature (4°C, 8°C and 18°C) and package. The evolution of physicochemical, biochemical and physiological parameters was follow during storage. It was found similar behavior between the two ripening stages evaluated. During storage without plastic film, it was found chilling injury at 4°C manifested by the high weight loss rate and the fast shriveling of the rind. Therefore, storage at 4°C is inadequate, but using modified atmospheres alleviate chilling injury. High weight loss rate and dehydration affecting external appearance could be considered as indicator of chilling injury in purple passion fruits. Sugars contents and catalase, peroxidase and polygalacturonase activities in 50% maturity stage fruits stored at 4°C in Control film, suggest its susceptibility at chilling temperatures.

Keywords: ripening, postharvest, storage, CAT, POD, sugars, organic acids

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XVI
Lista de símbolos y abreviaturas	XVII
Introducción	1
1. Marco teórico	7
1.1 Fruto de gulupa.....	7
1.2 Maduración de los frutos.....	8
1.3 Respiración de los frutos	9
1.4 Cambios metabólicos y bioquímicos durante la maduración y senescencia...	10
1.5 Efecto de las bajas temperaturas.....	14
1.6 Efecto del uso de atmósfera modificada y su efecto sinérgico con las bajas temperaturas	17
2. Materiales y métodos	19
2.1 Material vegetal y tratamientos	19
2.2 Parámetros fisiológicos.....	20
2.3 Parámetros bioquímicos y fisicoquímicos	23
2.3.1 Parámetros bioquímicos.....	24
2.3.2 Parámetros fisicoquímicos	28
2.4 Análisis estadístico	29
3. Resultados y discusión	31
3.1 Parámetros fisiológicos.....	34
3.1.1 Pérdida de peso fresco	34
3.1.2 CO ₂ y etileno	40
3.2 Parámetros bioquímicos	47
3.2.1 Ácidos orgánicos.....	47
3.2.2 Azúcares	54
3.2.3 Fenoles	61
3.2.4 Proteínas.....	64
3.2.5 Peroxidasa	68
3.2.6 Catalasa.....	70
3.2.7 Poligalacturonasa.....	73
3.3 Parámetros fisicoquímicos	76

3.3.1	Pérdida de peso.....	76
3.3.2	Color.....	79
3.3.3	pH, ATT, SST e IM	82
4.	Conclusiones y recomendaciones	91
4.1	Conclusiones.....	91
4.2	Recomendaciones.....	91
Anexo A: Regresiones del porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado.....		95
Anexo B: Fotografías de los frutos de gulupa durante el almacenamiento.....		97
Anexo C: Correlaciones		105
Bibliografía		107

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Fruto de gulupa	7
Figura 1-2: Cambios de coloración del exocarpo y arilo del fruto de gulupa durante la maduración. Se indica madurez según el porcentaje de color púrpura en el exocarpo.	8
Figura 2-1: Estados iniciales de los frutos de gulupa en dos estados de madurez...	19
Figura 2-2: Empaques empleados con dimensiones de 20x20cm.	20
Figura 2-3: Cámara hermética para medición de gases.....	22
Figura 3-1: Vida posrecolección de los frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) en condiciones sin empaque a bajas temperaturas ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $8\pm 2^{\circ}\text{C}$) y temperatura ambiente ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$).....	32
Figura 3-2: Vida posrecolección de los frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) a bajas temperaturas ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $8\pm 2^{\circ}\text{C}$) y a temperatura ambiente ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$), en los empaques Control y Makropol M.....	33
Figura 3-3: Promedios del porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) almacenados sin empaque en condiciones de temperatura ambiente ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$). Barras indican error estándar ($n=3$).....	35
Figura 3-4: Promedios del porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) almacenados sin empaque y a bajas temperaturas ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $8\pm 2^{\circ}\text{C}$). Barras indican error estándar ($n=3$).35	35
Figura 3-5: Porcentaje promedio de pérdida de peso fresco acumulado, en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) durante el almacenamiento a temperatura ambiente ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$) en los empaques Control y Makropol M. Barras indican error estándar ($n=3$).	37
Figura 3-6: Porcentaje promedio de pérdida de peso fresco acumulado, en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) durante el almacenamiento a bajas temperaturas ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $8\pm 2^{\circ}\text{C}$) en los empaques Control y Makropol M. Barras indican error estándar ($n=3$).	37
Figura 3-7: Respiración y producción de etileno en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) durante el almacenamiento a temperatura ambiente ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$) y sin uso de empaque. Barras indican error estándar ($n=3$).....	41
Figura 3-8: Respiración y producción de etileno en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) durante el almacenamiento a bajas temperaturas ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $8\pm 2^{\circ}\text{C}$) y sin uso de empaque. Barras indican error estándar ($n=3$).....	42

Figura 3-9: Evolución del CO ₂ y del etileno en la atmósfera al interior del empaque Makropol M, durante el almacenamiento a temperatura ambiente (18±2°C) de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura). Barras indican error estándar (n=3).	45
Figura 3-10: Evolución del CO ₂ y del etileno en la atmósfera al interior del empaque Makropol M, durante el almacenamiento a bajas temperaturas (4±2°C y 8±2°C) de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura). Barras indican error estándar (n=3).	45
Figura 3-11: Evolución de la concentración promedio (mg de ácido/100g de PF) de ácidos orgánicos en la pulpa de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco. Barras indican error estándar (n=3).	49
Figura 3-12: Evolución de la concentración promedio (mg de azúcar/g de PF) de ácidos orgánicos en la pulpa de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco. Barras indican error estándar (n=3).	55
Figura 3-13: Evolución de la concentración promedio de azúcares reductores (mg/100g de PF) en pulpa y cáscara de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco del tejido. Barras indican error estándar (n=3).	59
Figura 3-14: Evolución de la concentración promedio de fenoles (mg/100g de PF) en pulpa y cáscara de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco del tejido. Barras indican error estándar (n=3).	62
Figura 3-15: Evolución de la concentración promedio de proteínas solubles (mg/100g de PF) en pulpa y cáscara de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco del tejido. Barras indican error estándar (n=3).	66
Figura 3-16: Evolución de la actividad (UPOD=ΔAbsorbancia a 436nm/min*g PF) promedio de la enzima peroxidasa en pulpa y cáscara de frutos de gulupa almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaques Control y Makropol M. Estados de madurez: 50% y 75% de cáscara púrpura. PF: Peso fresco del tejido. Barras indican error estándar (n=3).	68
Figura 3-17: Evolución de la actividad (UCAT= μmol de H ₂ O ₂ descompuesto/min*g PF) promedio de la enzima catalasa en pulpa y cáscara de frutos de gulupa almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaques Control y Makropol M. Estados de madurez: 50% y 75% de cáscara púrpura. PF: Peso fresco del tejido. Barras indican error estándar (n=3).	71
Figura 3-18: Evolución de la actividad (UPG= μg glucosa/min*g PF) promedio de la enzima poligalacturonasa en pulpa y cáscara de frutos de gulupa almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaques Control y Makropol M. Estados de madurez: 50% y 75% de cáscara púrpura. PF: Peso fresco del tejido. Barras indican error estándar (n=3).	74
Figura 3-19: Porcentaje promedio (n=3) de pérdida de peso en frutos de gulupa almacenados a 4±2°C y 8±2°C en empaque Control. Estados de madurez: 50% y 75% cáscara púrpura. Las barras indican error estándar.	78

Figura 3-20: Promedios de la luminosidad (L^*), saturación (C^*) y tono (h) del color de la cáscara de frutos de gulupa almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaque control. Estados de madurez: 50% y 75% púrpura. Barras indican error estándar ($n=3$).....	80
Figura 3-21: Promedios de pH, ATT (% de ácido cítrico), SST ($^\circ\text{Brix}$) e IM (SST/ATT) de la pulpa de frutos de gulupa almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$. Estados de madurez: 50%, 75% y 100% púrpura. Barras indican error estándar ($n=3$).....	83

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1: Promedios (\pm SD) de los parámetros bioquímicos de los frutos de gulupa en dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) antes de aplicar los tratamientos (condiciones iniciales: cosecha) y al final del almacenamiento (último día del almacenamiento) a temperatura ambiental ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$), en empaque Control y Makropol M. Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) según la prueba LSD de Fischer. LSD: Diferencia mínima significativa. PF: peso fresco de tejido.....	48
Tabla 3-2: Promedios (\pm SD) de los parámetros fisicoquímicos de los frutos de gulupa antes de aplicar los tratamientos (condiciones iniciales: cosecha) y al final del almacenamiento (último día del almacenamiento) en condiciones de temperatura ambiental ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$), en empaque Control. Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) según la prueba de diferencias mínimas significativas de Fischer. LSD: Diferencia mínima significativa.....	77

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos

<i>Símbolo</i>	<i>Término</i>
α	Nivel de significancia estadístico
Δ	Diferencia
μ	Micro
λ	Longitud de onda

Abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Término</i>
° Brix	Grados brix
°C	Grados centígrados
Abs	Absorbancia
ATT	Acidez total titulable
CAT	Catalasa
C*	Saturación del color
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Gramo
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IM	Índice de madurez
L	Litro
L*	Luminosidad del color

Abreviatura Término

kg	Kilogramo
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
mg	Miligramo
min	Minuto
nm	Nanómetros
mM	Milimolar
PF	Peso fresco
PG	Poligalacturonasa
pH	Potencial de hidrógeno
POD	Peroxidasa
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SST	Sólidos solubles totales
U	Unidad de actividad enzimática

Introducción

La familia Passifloraceae, está representada por plantas trepadoras que trepan mediante zarcillos, aunque existen algunas especies de hábito arbóreo o arbustivo, cuyos frutos son principalmente de tipo baya (Hernández & Bernal 2000). Esta familia tiene distribución pantropical y comprende 18 géneros y cerca de 630 especies, de los cuales el género *Passiflora* L. es el más diversificado en la familia con casi 530 especies (Ocampo *et al.* 2007). En Colombia, esta familia está representada por 3 géneros y 167 especies de las cuales el 97% corresponden al género *Passiflora*, y el 3% restante a los géneros *Dilkea* y *Ancistrothyrsus* (Hernández & Bernal 2000, Ocampo *et al.* 2007), constituyéndose en el país con mayor riqueza de especies de la familia Passifloraceae en el neotrópico (Ocampo *et al.* 2007).

Las pasifloráceas son una familia promisoría desde varios puntos de vista, entre los que se encuentran el económico y el ornamental, este último debido a la forma de sus hojas y a la vistosidad de sus flores (Hernández & Bernal 2000), que históricamente fueron reconocidas como flores de la pasión, y en consecuencia actualmente esta familia y sus frutos se reconocen como frutos de la pasión (*passion fruits*). En Colombia, un total de 42 especies de ésta familia producen frutos comestibles, de las cuales nueve son comercializadas en mercados locales, nacionales o internacionales (Ocampo *et al.* 2007). Dentro del género *Passiflora*, la gulupa (*P. edulis* Sims), junto con la maracuyá (*P. edulis* fo. *flavicarpa* O.Deg.), la granadilla (*P. ligularis* Juss.) y la curuba (*P. tripartita* var. *mollissima* (Kunth) Holm-Niels. & P. Jørg), representan un valioso recurso genético de la diversidad colombiana y sus frutos tienen alto impacto en el sector productivo siendo muy apetecidos para comercialización nacional e internacional.

La especie *Passiflora edulis* Sims es originaria de Brasil, pero se introdujo en Colombia en la década de 1950, en donde se ha naturalizado, encontrándose entre los 1100 y 2750 m.s.n.m. bien sea en estado silvestre o cultivada (Ocampo *et al.* 2007), siendo principalmente producida en la región andina, sobre los 1.800 m.s.n.m. (Angulo 2010). En

Colombia, la cultura de consumo del fruto de gulupa aún está en sus comienzos, sin embargo este fruto tiene interesantes perspectivas de mercado, dado que ya alcanza el 40% de las exportaciones colombianas dentro del grupo de las pasifloráceas (Angulo 2010), además en la actualidad ocupa el tercer renglón dentro de las frutas exportadas al mercado europeo después del banano y la uchuva (OCATI S.A., empresa exportadora de frutas, comunicación personal 2010), destacándose que es mayor la importancia y reconocimiento que tiene la gulupa en el mercado internacional que en el nacional.

El mercado internacional del fruto de gulupa puede ser alcanzado mediante el transporte aéreo, pero considerando los altos costos de este tipo de transporte, se necesita explorar una alternativa más económica como el transporte marítimo que puede reducir el costo inclusive a la mitad, pero con el inconveniente de incrementar el tiempo de transporte. De manera que para lograr que ésta alternativa sea viable, se necesita prolongar el tiempo de almacenamiento del fruto de gulupa, además de buscar alternativas que disminuyan el costo del manejo dado que en la actualidad se emplea la película Xtend[®] como empaque primario pero su costo es alrededor de 500 pesos por bolsa.

Para alcanzar este mercado internacional, los frutos de gulupa deben tener un manejo tal que permita prolongar su tiempo de almacenamiento, entre los cuales el uso de tecnologías poscosecha como el sometimiento a bajas temperaturas es uno de los más ampliamente empleados; sin embargo, se han identificado problemas de manejo poscosecha como daños por efecto de bajas temperaturas durante la cadena de transporte y a temperaturas más altas la maduración temprana de los frutos antes de llegar a su destino, que conllevan a pérdidas debido al rechazo del producto con sobrecostos en el sector productivo. Aunque es bien conocido que las bajas temperaturas ayudan a prolongar el tiempo de almacenamiento de los frutos, también se sabe que los frutos tropicales son susceptibles a daños por frío, de manera que es importante estudiar el efecto de las bajas temperaturas sobre los frutos de gulupa y en particular su respuesta fisiológica, dado que este tipo de investigación aportará conocimientos que podrían constituirse en herramientas para el manejo del mismo, útiles para el sector productivo y fortalecimiento de la cadena de comercialización. Las principales limitantes para un manejo adecuado cosecha-poscosecha de los frutos de gulupa se centran en el desconocimiento de indicadores robustos que permitan la selección de los frutos atendiendo su condición fisiológica y bioquímica y considerando

los requerimientos del mercado. Por tal razón, el estudio del efecto de las bajas temperaturas de almacenamiento sobre la fisiología y bioquímica de los frutos de gulupa es un aspecto relevante para el manejo del fruto en condiciones de almacenamiento.

Entre los estudios referenciados en fisiología del fruto de gulupa (*Passiflora edulis* Sims), se han realizado estudios de la caracterización de diferentes estado de madurez del fruto de gulupa, recién cosechados, evaluando parámetros físicos como pérdida de peso, color, densidad, firmeza y tamaño; y químicos como pH, acidez (ATT), sólidos solubles totales (SST), índice de madurez, azúcares, ácidos orgánicos y proteínas (Flórez *et al.* 2012, Pinzón *et al.* 2007). Y se ha determinado el momento óptimo de cosecha del fruto de gulupa que corresponde a un fruto 40-50% verde y 40-50% púrpura (Pinzón *et al.* 2007) o que puede incluso estar entre el intervalo 50-70% de cáscara púrpura (Flórez *et al.* 2012).

En relación a la poscosecha del fruto de gulupa, Flórez *et al.* (2012) han realizado estudios en frutos de gulupa con madurez del 0% (madurez fisiológica-90 días después de la floración), 30%, 50%, 70% y 100%, según el color púrpura de la cáscara, en los que estudiaron la respiración, producción de etileno, y parámetros fisicoquímicos de calidad (pH, ATT, SST, índice de madurez y color) durante el almacenamiento a temperatura ambiente, encontrando que la gulupa tiene un patrón de respiración climatérico, y que el pico de CO₂ precede al de etileno. También Kishore *et al.* (2011) han evaluado parámetros de calidad (pérdida de peso, ATT, SST, porcentaje de jugo, azúcares reductores y no reductores) y atributos sensoriales de frutos de gulupa tras su almacenamiento a 6, 8, 11 y 25°C.

Adicionalmente, durante la poscosecha de gulupa, Shiomi *et al.* (1996a) han estudiado la biosíntesis del etileno, estudiando la evolución del contenido del ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) y las actividades de ACC sintasa y ACC oxidasa, y adicionalmente también caracterizaron la evolución de los contenidos de glucosa, sacarosa, fructosa, ácido cítrico, ácido málico y algunos aminoácidos durante el almacenamiento poscosecha a temperatura ambiental (25°C) de frutos de gulupa, en estado de madurez en el que inicia el cambio de coloración a púrpura. Shiomi *et al.* (1996a) indicaron que los frutos de gulupa, pueden ser transportados en frío al lugar de venta y allí se puede inducir el cambio de color de verde a morado aplicando etileno.

Mientras que en otro estudio, durante la poscosecha (25°C) de frutos de gulupa en distintos estados de madurez entre 40-90 días después de la floración, Shiomi *et al.* (1996b) evaluaron la tasa respiratoria, producción de etileno, pérdida de peso, SST y ATT.

Con respecto al uso de tecnologías poscosecha para la aplicación en gulupa, se han desarrollado estudios con el uso de empaques con películas plásticas y refrigeración. Entre estos, se ha evaluado el uso de empaque comercial Xtend® durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiental, estudiando parámetros de calidad fisicoquímicos (pérdida de peso, textura, color, ATT, SST), contenidos de ácidos orgánicos y de azúcares, tasa de respiración, y producción de etileno (Castellanos-Espinosa 2010, Díaz *et al.* 2012). Adicionalmente también se ha reportado el desarrollo de empaques especialmente diseñados para la gulupa, con propiedades antiempañantes y antimaduración denominados Makropol F y Makropol M respectivamente, que se probaron sensorialmente en frutos con 70-80% de madurez provenientes del Departamento de Cundinamarca y en condiciones de almacenamiento a 8°C (Martínez 2010, Gutiérrez 2010). De manera que se ha reportado que el empaque Makropol M, presenta una alternativa más económica y de origen nacional al uso del empaque Xtend® que es el que comercialmente ha sido empleado para la gulupa (Martínez 2010).

Por otra parte, otro fruto que está incluido en la misma especie de la gulupa, pero que constituye una variedad es la maracuyá (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa*), la cual ha sido más estudiada debido a su mayor reconocimiento. Es posible encontrar reportes de fisiología poscosecha y el efecto de tratamientos como empaques, ceras y temperaturas en maracuyá (Arjona *et al.* 1992, Aular *et al.* 2001, Gómez 2000, Quesada & Matta 1992). Además, se ha estudiado la actividad de enzimas como pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa (Aponte & Guadarrama 2003, Menéndez-Aguirre *et al.* 2006); análisis de la hidrólisis enzimática de compuestos responsables del aroma (Chassagne *et al.* 1999), tratamientos realizados con etileno (Arjona & Matta 1991). Gómez (2000) reportó que la utilización de empaque plástico combinado con una temperatura entre 10 y 12°C, prolonga en un 50% el tiempo de conservación del maracuyá (30 días), disminuye las pérdidas de peso y estabiliza la composición química del fruto.

Considerando la necesidad de prolongar el período de almacenamiento de los frutos de gulupa, para atender las necesidades de exportación, es necesario reducir la respiración del fruto y su metabolismo, de manera que se retarde el proceso de maduración y senescencia y se prolongue el almacenamiento. Para esto se han empleado en diferentes tipos de frutos técnicas como el almacenamiento a bajas temperaturas y el uso de empaques que proveen atmósferas modificadas, que utilizados en conjunto son la técnica más ampliamente empleada para el transporte marítimo.

Actualmente algunas empresas exportadoras como OCATI han evidenciado que bajo las condiciones de almacenamiento, transporte y empaque los frutos se maduran o sobremaduran y sufren daños antes de llegar a su sitio de destino perdiéndose calidad del fruto para el consumo (OCATI, comunicación personal 2010). De manera que también se hace evidente el desconocimiento de las condiciones de madurez adecuadas que le permitan a los frutos de gulupa alcanzar dichos mercados transcontinentales. De esta manera, y atendiendo a la condición climatérica de los frutos de gulupa, para el manejo poscosecha deben considerarse frutos con estados posteriores a la madurez fisiológica, los cuales puedan alcanzar después de la cosecha los cambios de maduración esperados del fruto; pero que sean estados de madurez previos a la maduración plena (en la que los frutos ya han desarrollado 100% de color púrpura en la cáscara) para poder hacer un manejo poscosecha. Por lo cual en la presente investigación se propuso la evaluación de los estados de madurez: 50% y 75% de color púrpura en la cáscara, considerando que en estudios previos se ha indicado que estos son estados posteriores a la madurez fisiológica (Flórez 2012).

Con la presente investigación se procuró resolver la pregunta: ¿Cómo las bajas temperaturas afectan la fisiología de los frutos de gulupa después de maduración fisiológica?, para lo cual se planteó como objetivo general evaluar el efecto de las bajas temperaturas de almacenamiento sobre la respuesta fisiológica de frutos de gulupa en diferentes estados de madurez; y como objetivos específicos: I. Establecer el efecto de las bajas temperaturas en los parámetros fisiológicos y en algunos parámetros bioquímicos de frutos de gulupa, con el fin de determinar cuáles de ellos pudieran ser utilizados como indicadores para manejo del fruto; y II. Determinar parámetros fisicoquímicos en frutos de gulupa que puedan ser utilizados como herramienta de monitoreo del efecto de las bajas temperaturas.

1. Marco teórico

1.1 Fruto de gulupa

La gulupa pertenece a la especie *Passiflora edulis* Sims, y se caracteriza por tener frutos de 4-6 cm de longitud, con exocarpo color púrpura y semillas negras (Figura 1-1), que la diferencian de la maracuyá, que es una variedad dentro de la especie (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg.) la cual tiene frutos de mayor tamaño, con exocarpo amarillo y semillas de color café oscuro. La parte comestible del fruto de gulupa es el arilo que rodea las semillas, constituyéndose en la pulpa que se emplea para el consumo fresco, o para la preparación de jugos, néctares y postres.

Con el transcurso de la maduración, el fruto de gulupa cambia el color externo de la cáscara (exocarpo) de verde en estado inmaduro a púrpura, y al interior del fruto el arilo cambia la coloración de amarillo claro a amarillo intenso o naranja (Orjuela-Baquero *et al.* 2011 (Figura 1-2)).

Figura 1-1: Fruto de gulupa

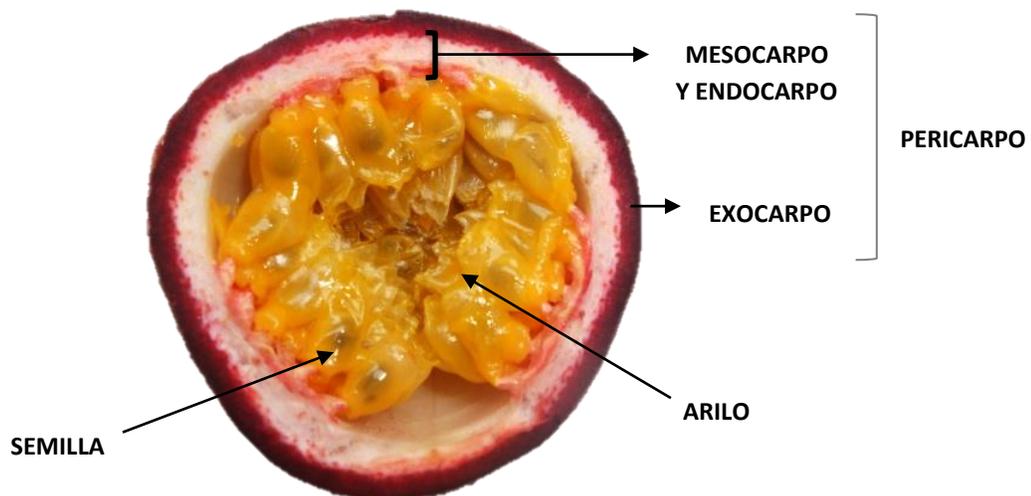
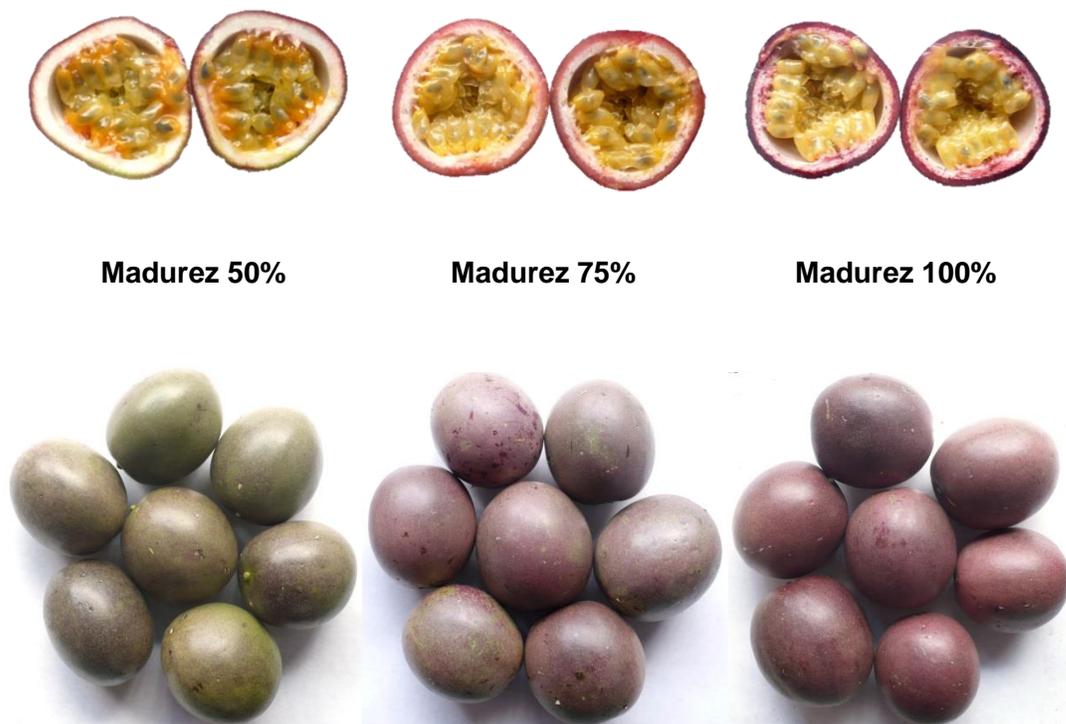


Figura 1-2: Cambios de coloración del exocarpo y arilo del fruto de gulupa durante la maduración. Se indica madurez según el porcentaje de color púrpura en el exocarpo.



1.2 Maduración de los frutos

La madurez fisiológica es el estado de desarrollo del fruto en el cual puede continuar con su ontogenia aún si es desprendido de la planta (Shewfelt & Prussia 1993), pero es un concepto distinto al de madurez organoléptica, que está asociado al estado de desarrollo del fruto que posee los prerequisites para ser empleado para su consumo, y está asociado a la satisfacción de unas propiedades organolépticas determinadas por el consumidor. Entonces, la maduración organoléptica es un proceso que en general comienza durante la etapa final de la maduración y constituye el inicio de la senescencia, mediante el cual se desarrollan las características de consumo que transforman el fruto fisiológicamente maduro en un fruto organolépticamente maduro que es visual, olfativa y gustativamente atractivo (Wills *et al.* 1998).

La maduración es un proceso regulado genéticamente que involucra la activación de rutas metabólicas primarias y secundarias que en conjunto ocasionan eventos

bioquímicos entre los que se incluyen cambios en el color, acidez, azúcares, textura y aroma que son cruciales para la calidad sensorial (Bouzayen *et al.* 2010, Javanmardi & Kubota 2006, Wills *et al.* 1998).

La maduración del fruto se considera como una reorganización metabólica, es decir un proceso programado, controlado por señales hormonales y ambientales, entre las que el etileno desempeña un rol importante (Bouzayen *et al.* 2010, Frenkel *et al.* 1968), en el cual son sintetizadas las enzimas que conducen al progreso de dicho proceso (Frenkel *et al.* 1968).

Los frutos se dividen en climatéricos y no climatéricos según su mecanismo de maduración, de manera que los frutos climatéricos presentan un fuerte aumento de la respiración y un concomitante incremento de etileno que coincide con la madurez organoléptica, mientras que los frutos no climatéricos no presentan un cambio dramático en la respiración y sus niveles de etileno permanecen bajos (Kader 1992, Payasi & Sanwal 2010).

En los frutos climatéricos el etileno producido estimula su propia síntesis, mecanismo que es reconocido como un proceso autocatalítico (Wills *et al.* 1998). La producción autocatalítica de etileno en los frutos climatéricos es percibida por receptores de etileno y se transduce en una cascada de modo que activa numerosos factores de transcripción que a su vez activan directa o indirectamente numerosos genes blanco, y la acción acumulativa de estos genes es la que ocasiona cambios en el fruto como la degradación de clorofilas, y el desarrollo de pigmentos, el ablandamiento debido a la degradación de la pared celular, el desdoblamiento de los almidones que conlleva a la acumulación de azúcares, la acumulación de metabolitos secundarios y la producción de aroma, entre otros (Payasi & Sanwal 2010).

1.3 Respiración de los frutos

La energía que los frutos requieren para mantener su metabolismo, proviene de la respiración aeróbica, que implica la degradación oxidativa de sustancias orgánicas almacenadas en los tejidos, siendo la glucosa el principal sustrato empleado, aunque además de ésta, los ácidos cítrico y málico, que se encuentran almacenados en las

vacuolas, también pueden emplearse como sustratos respiratorios (Wills *et al.* 1998).

En el fruto, ésta glucosa no se encuentra libre, sino que se encuentra en forma de carbohidratos de reserva como almidón o sacarosa, que deben ser degradados a glucosa y fructosa, las cuales son posteriormente oxidadas mediante la vía glicolítica, produciendo energía en forma de ATP y piruvato, y éste último a su vez se continúa oxidando en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, de manera que los productos de estas reacciones son ATP y CO₂ (Wills *et al.* 1998). En estas dos vías, también se producen NADH y FADH₂ que a su vez se oxidan por fosforilación oxidativa produciendo más ATP y agua, con el consumo de oxígeno (Wills *et al.* 1998). Así, que en resumen, por estos procesos oxidativos que ocurren durante la respiración, además de la glucosa también se requiere de oxígeno, y se producen dióxido de carbono, agua y energía; y de ésta energía liberada la mayoría puede emplearse posteriormente en reacciones de síntesis o interconversiones metabólicas, pero una pequeña parte es disipada en forma de calor (Wills *et al.* 1998).

Mientras los frutos permanecen unidos a la planta, las pérdidas debidas a la respiración y transpiración son compensadas por la savia de la planta que les provee agua y fotosintatos, pero cuando son cosechados, los frutos continúan obteniendo energía a partir de la respiración para mantener su metabolismo, pero las pérdidas asociadas a este proceso ya no son compensadas, por lo cual los frutos deben empezar a consumir sus reservas, y en consecuencia se hacen perecederos (Wills *et al.* 1998).

1.4 Cambios metabólicos y bioquímicos durante la maduración y senescencia

Se ha establecido que en el proceso de maduración ocurren cambios en la velocidad de la respiración de los frutos después de cosechados, que demuestran disminuir hasta un mínimo respiratorio para luego observar una elevación muy súbita que constituye el climaterio respiratorio; éste aumento lleva a los frutos climatéricos a experimentar cambios en su composición y propiedades fisicoquímicas.

En los frutos climatéricos se alcanza la madurez organoléptica después del inicio del climaterio. Durante la maduración del fruto, el color cambia de verde a amarillo, naranja, rojo o púrpura según sea el caso, debido a la degradación de la clorofila, y a la simultánea síntesis o desenmascaramiento de otros pigmentos como carotenoides y antocianinas, además, se producen cambios en el aroma como consecuencia de la síntesis de compuestos volátiles responsables del mismo (Wills *et al.* 1998).

Durante la maduración, también se degradan carbohidratos poliméricos, de manera que el almidón se hidroliza en azúcares, afectando el sabor como la textura del fruto, y favoreciendo la palatabilidad por el sabor más dulce. Por su parte, los ácidos orgánicos se acumulan durante la maduración del fruto y después son utilizados como sustratos respiratorios durante el *ripening* de los mismos (Moing *et al.* 2001), de manera que su contenido disminuye con el transcurso de la maduración (Wills *et al.* 1998) y estos cambios afectan el sabor del fruto.

Se tienen evidencias de la síntesis de proteínas durante la maduración, la que conlleva al incremento del contenido de estas macromoléculas con la maduración del fruto, ya que se ha reportado que la aplicación de "inhibidores de proteínas" afectan la maduración (Frenkel *et al.* 1968), de manera que las proteínas que se sintetizan durante éste proceso son enzimas que son requeridas para que ocurran los cambios propios del mismo. Entonces, durante el período climatérico, ocurre un incremento en la síntesis de proteínas en tanto que durante la senescencia hay una degradación de las enzimas y disminución de la actividad metabólica (Wills *et al.* 1998).

El sistema antioxidante se encarga de proteger la integridad estructural y funcional celular mediante la remoción de especies reactivas de oxígeno, como los radicales superóxido e hidroxilo y peróxido de hidrógeno, las cuales atacan biomoléculas ocasionando el deterioro de las membranas, la peroxidación de lípidos y mutación en el DNA, conllevando a disfunciones metabólicas y estructurales irreparables y finalmente a la muerte celular. La maduración y senescencia de los frutos se caracteriza por la promoción de procesos de daño oxidativo que contribuyen al deterioro general del metabolismo, es así que se ha encontrado que durante la maduración del fruto se incrementan la formación de iones superóxido y la acumulación de peróxido de hidrógeno, lo cual se expresa en la acumulación de productos de la oxidación de

proteínas y de la peroxidación de lípidos; de manera que el sistema antioxidante desempeña un rol importante en los procesos de maduración y senescencia de los frutos aportando al balance entre la inducción de especies reactivas de oxígeno y su remoción (Jiménez *et al.* 2002). De manera que durante la senescencia los daños oxidativos se pueden acelerar debido a una depresión en los sistemas antioxidantes (Jiménez *et al.* 2002). El decrecimiento de los sistemas antioxidantes puede resultar en una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno y estar entonces implicado en la maduración y senescencia del fruto, de manera que la maduración y consecuente senescencia del fruto está acompañada por un paso progresivo hacia un estado oxidado (Awad *et al.* 2011).

Como parte de este sistema antioxidante, se encuentran componentes con actividad enzimática como la peroxidasa (POD) y catalasa (CAT), y otros no enzimáticos como los fenoles y el ácido ascórbico. La peroxidasa (EC 1.11.1.7) es una oxidoreductasa que posee un grupo hemo, la cual oxida las moléculas fenólicas empleando H_2O_2 como cosustrato. La POD es una enzima ubicua localizada en numerosos compartimentos celulares incluyendo el cloroplasto y la mitocondria (Martínez *et al.* 2001).

En los frutos, los principales tipos de compuestos fenólicos son ácidos cinámicos, catequinas, antocianinas y flavonoles, los cuales son sustancias derivadas de la vía del shikimato y del metabolismo de los fenilpropanoides. Los compuestos fenólicos solubles se encuentran en la vacuola. Los fenoles pueden actuar como antioxidantes, mediante numerosos mecanismos: remoción de radicales libres, donación de hidrógenos, disipación del oxígeno singlete, como sustrato para el ataque por superóxido, o quelación de iones metálicos reduciendo la formación de radicales libres inducidos por la reacción de Fenton. Sin embargo, los fenoles también pueden actuar como sustratos para reacciones de oxidación, como las catalizadas por polifenoloxidasas (PFO) y peroxidases (POD) que conllevan al pardeamiento en los frutos (Robards *et al.* 1999).

Durante la maduración, los frutos experimentan cambios en la consistencia de sus tejidos, los cuales son en gran medida debidos al desensamblaje de la pared celular como consecuencia de modificaciones estructurales de las pectinas, hemicelulosas y celulosas, que son los carbohidratos poliméricos responsables de la integridad estructural de la pared celular (Hadfield & Bennet 1998, Goulao & Oliveira 2008, Wills *et al.* 1998).

También se presenta reducción en la adhesión celular por causa del rompimiento y disolución de la lamela media, la cual es rica en pectina, lo cual puede ocurrir temprano o más tarde en la maduración dependiendo del tipo de fruto (Brummell & Harpster 2001). Este desensamblaje se asocia con los últimos estados de la maduración y con el deterioro del fruto en los estados sobremaduros. De manera que el ablandamiento tardío y el deterioro de los tejidos se asocia con el desensamblaje de las pectinas que debilita la integridad estructural de las paredes celulares (Wills *et al.* 1998).

El desensamblaje de las pectinas está mediado por la acción de varias enzimas, entre las cuales la acción de las poligalacturonasas (PG) ocurre después de los primeros estados de ablandamiento del fruto, y parece contribuir significativamente a los estados sobremaduros de ablandamiento y deterioro (Hadfield & Bennet 1998). Las poligalacturonasas [poli(1→4- α -D-galacturonido)glicanohidrolasas] son enzimas que catalizan el rompimiento hidrolítico de los enlace galacturónidos, y pueden ser de tipo endo(EC 3.2.1.15) o exo(EC 3.2.1.67), el primero rompe el ácido poligalacturónico al azar y a este tipo es al que se refiere usualmente como la PG implicada en la ripening del fruto, mientras que el segundo remueve únicamente unidades del ácido galacturónico del extremo no reducido del polímero. Sin embargo, ambos tipos de la enzima se encuentra en los frutos. Los sustrato de PG en la pared celular son fundamentalmente poligalacturonanos de las pectinas, las cuales son componentes esenciales de las paredes celulares y son responsables de la firmeza de las asociaciones celulares en los tejidos y por consiguiente determinan la consistencia del fruto (Protsenko *et al.*, 2010). De esta manera, la PG participa en la solubilización y despolimerización de poliurónidos durante la maduración del fruto y aunque esta acción hace una pequeña contribución al ablandamiento del fruto, ésta despolimerización de las pectinas debida a la PG no es suficiente o necesaria para que ocurra aun la maduración y ablandamiento normales de los fruto (Brummell & Harpster 2001, Goulao & Oliveira 2008).

Hacia los últimos estados de la maduración ocurren cambios fisiológicos relacionados con la senescencia que conllevan al deterioro de la membrana y a la muerte celular (Bouzayen *et al.* 2010). Durante la senescencia, ocurren cambios composicionales que conllevan a la pérdida de funcionalidad de las membranas, lo cual se inicia con la disminución de la fluidez de la membrana, que conlleva a la afectación de su permeabilidad, desencadenando entonces la pérdida de iones, y de esta manera, se

conduce a un incremento de Ca^{2+} en el citosol que activa la acción de las fosfatasa y fosfolipasas, produciendo ácidos grasos libres que son peroxidados por las lipoxigenasas conllevando a la producción de radicales libres, los cuales a su vez desencadenan una oxidación celular generalizada que ocasiona la descompartimentalización celular incrementando la pérdida de iones, además, la peroxidación a su vez conlleva al incremento de la formación de fase gel y con esto acentúa la pérdida de funcionalidad de la membrana (Marangoni *et al.* 1996).

Dado al incremento respiratorio que se produce después de la cosecha de los frutos, su deterioro en condiciones ambientales es acelerado, lo cual limita su tiempo de almacenamiento bajo estas condiciones. De esta manera es adecuado reducir la respiración con fines de prolongación del tiempo de almacenamiento del fruto, para lo cual se han empleado técnicas como el almacenamiento en bajas temperaturas y el uso de empaques que provean atmósferas modificadas.

1.5 Efecto de las bajas temperaturas

La temperatura es el factor más importante durante la poscosecha de los frutos, puesto que el metabolismo es afectado por la temperatura, dado que la velocidad de las reacciones enzimáticas se reduce con la disminución de la temperatura en el rango fisiológico (de 0-30°C) (Wills *et al.* 1998), incluyendo las involucradas en la respiración y senescencia, y también disminuye la tasa de crecimiento y proliferación de los microorganismos (Shewfelt & Prussia 1993). De manera que el almacenamiento a bajas temperaturas disminuye la tasa de respiración y la velocidad del metabolismo celular, retardando los procesos metabólicos que conllevan a la maduración y senescencia de frutos, a su deterioro y por consiguiente pérdida de la calidad de consumo (Imahori *et al.* 2008, Sevillano *et al.* 2009, Wills *et al.* 1998); por esta razón, el almacenamiento a bajas temperaturas es una técnica ampliamente utilizada para prolongar la vida útil de los frutos después de haber sido cosechados, siendo la herramienta más efectiva que permite mantener la calidad y prolongar el almacenamiento de los frutos.

La maduración organoléptica normal de los frutos, ocurre entre 10 y 30°C, de manera que el máximo incremento del almacenamiento del fruto se logra a temperaturas inferiores a este intervalo. En los frutos climatéricos las bajas temperaturas retrasan la

maduración organoléptica, reduciendo la producción de etileno y la respuesta de los tejidos a este (Wills *et al.* 1998).

Sin embargo, en frutos tropicales y subtropicales, se ha reportado que estas bajas temperaturas pueden ocasionar daño por frío, el cual es un desorden fisiológico que ocurre típicamente a temperaturas por debajo de los 10°C, y por encima del punto de congelación de los tejidos (Graham & Patterson 1982, Pérez-Tello *et al.* 2009). La extensión del daño es función de la temperatura y del tiempo de exposición a ésta, así como de factores genéticos y del estado de madurez del fruto, de manera que el daño por frío es más severo con la exposición del fruto a temperaturas más bajas y períodos de tiempo más prolongados (Imahori *et al.* 2008, Lim *et al.* 2009).

Los primeros eventos a nivel molecular del daño por frío son aquellos que afectan la permeabilidad de la membrana, como las alteraciones en la conformación y estructura de la membrana celular, encontrándose incrementos en la pérdida de electrolitos y cambios en la composición lipídica (Sevillano *et al.* 2009). Estos cambios en la composición de los lípidos de membrana son semejantes a aquellos que ocurren durante la senescencia, y son los que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad, que conlleva a la reducción de la funcionalidad de la membrana y de las proteínas asociadas a ella, siendo los más significativos: la peroxidación de lípidos, el incremento en el índice de saturación de los ácidos grasos y la degradación de fosfolípidos y galactolípidos (Sevillano *et al.* 2009, Marangoni *et al.* 1996). Durante el daño por frío ocurre la formación de separaciones de fase lateral de las membranas (Marangoni *et al.* 1996).

Las bajas temperaturas inducen cambios en la estructura celular y alteran procesos metabólicos. A medida que la temperatura desciende, las bicapas lipídicas de membrana cambian su composición lipídica y su estructura, perdiendo fluidez, de manera que puede afectarse su integridad y conllevar a la pérdida de gradientes iónicos y de solutos a través de la misma (Arafat 2005). En adición a la pérdida de funcionalidad de la membrana, las bajas temperaturas también aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno induciendo el estrés por daño oxidativo, (Imahori *et al.* 2008, Lim *et al.* 2009, Sevillano *et al.* 2009), el cual es considerado como la respuesta más temprana del tejido sensible al daño por frío (Imahori *et al.* 2008), y que ocurre cuando este

incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno perturba la homeostasis celular (Sevillano *et al.* 2009).

Las especies reactivas de oxígeno son formas de oxígeno atmosférico parcialmente reducidas, que se derivan de su excitación para formar el oxígeno singlete o por la transferencia de uno, dos o tres electrones para generar el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo respectivamente (Sevillano *et al.* 2009). Estas, pueden oxidar los componentes celulares y ocasionar daño en membranas, proteínas y ácidos nucleicos, alterando la homeostasis celular y llevando a la destrucción oxidativa de la célula; sin embargo, el sistema antioxidante que incluye metabolitos antioxidantes como el ascorbato, glutatión, α -tocoferol y β -caroteno, y enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidasa, ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11), superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) y glutatión reductasa (GR, EC 1.8.1.7) pueden mitigar los daños detoxificando eficientemente estas especies reactivas de oxígeno, y desempeñando un rol importante en la protección de los frutos ante el daño por frío (Lim *et al.* 2009, Sevillano *et al.* 2009). Las bajas temperaturas también pueden afectar la actividad de dichas enzimas, inactivándolas y/o impidiendo su regeneración, alterando entonces la homeostasis entre la generación de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos naturales de defensa, ocasionando un incremento neto de los primeros y el consecuente daño celular por estrés oxidativo (Arafat 2005, Sevillano *et al.* 2009). El contenido de antioxidantes, además de depender de los factores ambientales, también está en función del estado de maduración del fruto (Javanmardi & Kubota 2006).

Las enzimas antioxidantes cuya actividad al parecer es más influenciada por el grado de sensibilidad o tolerancia al daño por frío son catalasa, peroxidasas y superóxido dismutasa, de hecho en las plantas catalasa es una de las primeras enzimas del sistema antioxidante en ser activada como respuesta al estrés oxidativo ocasionado por el daño por frío (Sevillano *et al.* 2009).

También se ha encontrado que las bajas temperaturas tienen efectos sobre las concentraciones de compuestos fenólicos, ácido ascórbico y actividad antioxidante (Graham & Patterson 1982, Shin *et al.* 2007), además de ocasionar la acumulación de

azúcares (Graham & Patterson 1982) y el incremento de la actividad de la poligalacturonasa (PG, EC 3.2.2.15) (Rugkong *et al.* 2010).

Entonces, entre las manifestaciones del daño por frío están la pérdida de solutos, pérdida de la integridad de las membranas, pérdida de compartimentalización, y el incremento en la producción de etileno y en la respiración (Shewfelt & Prussia 1993). Estas manifestaciones fisiológicas del daño por frío usualmente preceden u ocurren concomitantemente con la aparición de síntomas visibles (Purvis 2002), los cuales incluyen alteración del color, reblandecimiento, pardeamiento, hundimientos de la superficie, lesiones acuosas superficiales, descoloración interna, falla en completar la maduración, escaldado, desarrollo de sabores rancios y de olores no propios de la maduración normal del fruto (Arafat 2005, Kader 1992, Pérez-Tello *et al.* 2009, Shewfelt & Prussia 1993). De manera que este efecto de las bajas temperaturas sobre los frutos es un problema de la poscosecha que reduce la calidad de los mismos y su susceptibilidad de ser comercializados.

1.6 Efecto del uso de atmósfera modificada y su efecto sinérgico con las bajas temperaturas

Esta atmósfera se puede obtener de manera activa reemplazando la atmósfera al interior del empaque por una mezcla de gases de concentraciones deseadas, o de forma pasiva. Esta última se obtiene por difusión a través de la película de empaque y gracias al metabolismo del fruto al interior del empaque sellado, de manera que se va alcanzando una atmósfera de equilibrio dependiente de las características de permeabilidad de la película polimérica que constituye el empaque y de la tasa respiratoria del fruto, en general incrementándose las concentraciones de CO₂ y disminuyendo las de O₂ respecto a las atmosféricas, de manera que se reduzca la respiración del fruto y evitando que se produzcan condiciones anóxicas o altos niveles de CO₂ que conduzcan al metabolismo fermentativo (Sandhya 2010, Kader & Watkins 2000).

Otros beneficios del uso de empaques con películas poliméricas, es el mantenimiento de una alta humedad relativa y la reducción de la pérdida de agua del fruto, además de reducir la contaminación y abrasión durante la manipulación y transporte y la reducción

de la dispersión de enfermedades entre una unidad de empaque y otra (Kader & Watkins 2000). Además se ha reportado que las atmósferas modificadas, altas en CO₂ y agua y bajas en O₂, son efectivas para aliviar los síntomas de daño por frío en frutos sensibles al daño por frío como mango (Pesis *et al.* 2000) y carambola (Ali *et al.* 2004a).

De esta manera se ha reportado que el uso de bajas temperaturas concomitantemente con el uso de películas plásticas que confieren atmósfera modificada, permite una mayor conservación de los frutos, evidenciada en el prolongamiento del tiempo de almacenamiento de los frutos (Espinoza *et al.* 2008, Hernández & Fischer 2009, Sáenz *et al.* 1991).

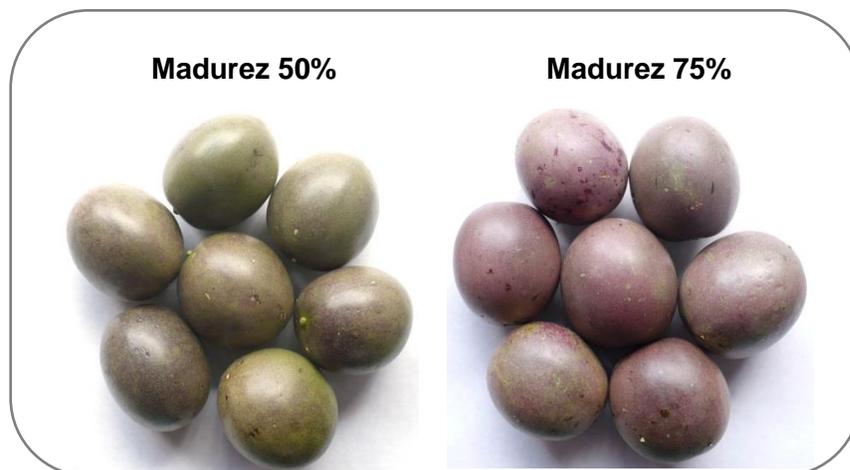
2. Materiales y métodos

2.1 Material vegetal y tratamientos

Material vegetal: Los frutos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) fueron proporcionados por la empresa OCATI S.A., los cuales provenían de fincas ubicadas en Cundinamarca y Boyacá. Después de haber sido sometidos a las condiciones de adecuación por OCATI S.A., se seleccionaron frutos con tamaños homogéneos y se clasificaron en dos estados sucesivos de madurez (después de madurez fisiológica) indicados por el color externo de la cáscara (exocarpo): 50% y 75% púrpura (Figura 2.1). Lo anterior considerando que en estudios previos se ha relacionado la madurez de los frutos de gulupa con el color de su cáscara (Pinzón *et al.* 2007).

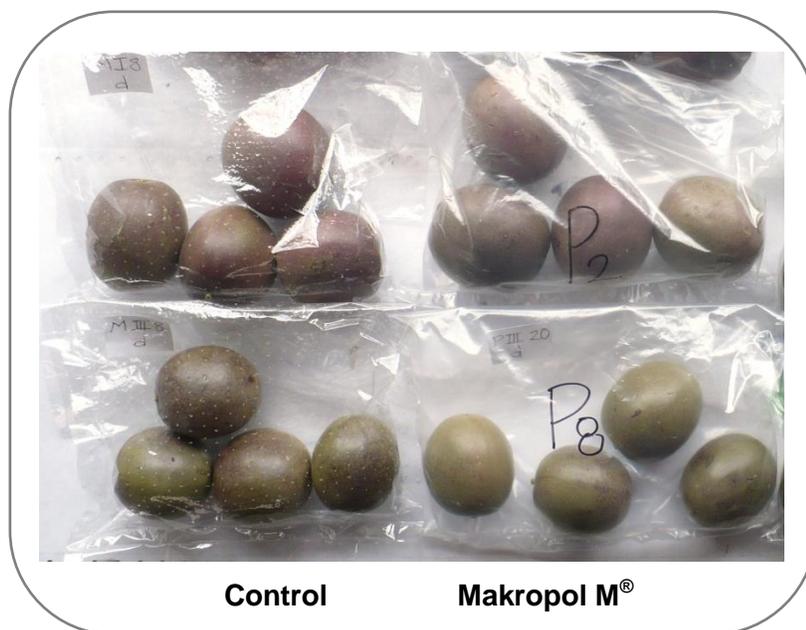
Temperatura de almacenamiento: se evaluaron dos temperaturas de refrigeración: $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $8\pm 2^{\circ}\text{C}$, y un control a temperatura ambiente ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Figura 2-1: Estados iniciales de los frutos de gulupa en dos estados de madurez.



Empaque: Se emplearon dos tipos de empaque (Figura 2-2). Uno con base en polipropileno microperforado, el cual fue considerado como Control dado que permite reducir la extrema deshidratación del fruto y su rápido deterioro, y a su vez facilita la manipulación de las unidades experimentales. El otro empaque evaluado, fue Makropol M desarrollado por el Grupo de Investigación de Macromoléculas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, con base en polietileno de baja densidad y con adición de un retardante de la maduración (en proceso de registro de Patente), al cual se le realizaron 6 perforaciones del grosor de una aguja, para imitar a aquellas presentes en el empaque comercial Xtend[®] empleado para la distribución de la gulupa por la empresa Ocati S.A.

Figura 2-2: Empaques empleados con dimensiones de 20x20cm.



2.2 Parámetros fisiológicos

Estas determinaciones se realizaron en las instalaciones del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, en el Laboratorio de Poscosecha de la Sede de enlace Bogotá.

2.1.1. Ensayo 1

Se realizó un experimento para estudiar el efecto de las bajas temperaturas sobre la fisiología del fruto de gulupa y su dependencia del estado de madurez, evaluando la pérdida fisiológica de peso fresco, y la producción de CO₂ y etileno.

Para ello se evaluaron los dos estados de madurez antes mencionados. Los frutos de ambos estados de madurez se almacenaron bajo las 3 condiciones de temperatura ya explicadas el numeral 2.1 y sin empaque. Diariamente se tomaron mediciones para establecer la pérdida de peso, y producción de etileno y CO₂. La unidad experimental consistió en un fruto, y se evaluaron triplicados por cada tratamiento.

El día en el cual se aplicaron los tratamientos se denominó como “Día cero”, que correspondió al tercer día después de la cosecha.

Pérdida de peso fresco

La pérdida de peso se registró midiendo el peso inicial (en el día de inicio del ensayo) y el peso final (registrado en el día de medición) de cada unidad experimental empleando una balanza electrónica (Ohaus). Se indicó como el porcentaje de pérdida de peso acumulado calculado como la diferencia entre el peso inicial y final expresado en porcentaje respecto al peso inicial.

CO₂ y etileno

Las mediciones de gases se realizaron bajo las respectivas condiciones de temperatura de cada tratamiento. Diariamente, tres unidades experimentales por tratamiento se introdujeron en cámaras herméticamente cerradas durante 1 y 2 h para la cuantificación de las tasas de CO₂ (mg/kg*h) y etileno (μL/kg*h) respectivamente, producidos al interior de la cámara (Figura 2.3).

El etileno y el CO₂ se analizaron mediante un cromatógrafo de gases (Agilent 4890D) acoplado a un integrador (Hewlett-Packard 3395/3396) y equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un detector de conductividad térmica (TCD), respectivamente,

según Hernández *et al.* (2007). Se empleó una columna Super-qplot hp 19095P con fase granulada, la cual fue previamente calibrada con estándares certificados de 2% CO₂ y 10 ppm de etileno (AGA, Bogotá). Para etileno, las temperaturas del horno, inyector, y detector FID fueron de 30, 50 y 250°C respectivamente. Para CO₂, las temperaturas del horno, inyector, y detector TCD fueron de 30, 50 y 300 °C respectivamente. El flujo de gas transportador (Helio, aire artificial, hidrógeno) fue de 30, 300 y 48 mL/min.

A partir de las curvas de calibración, se calcularon las concentraciones de estos gases en la muestras partiendo del área bajo la curva de los picos en los cromatogramas.

Figura 2-3: Cámara hermética para medición de gases.



2.1.2. Ensayo 2

Dados los resultados del Ensayo 1, se llevó a cabo un segundo experimento (Ensayo 2) para evaluar si con el uso de empaques se atenuaba o cambiaba el efecto de las bajas temperaturas. De manera que se probaron dos tipos de películas para empacar los frutos de gulupa: control y Makropol (ya explicados en el numeral 2.1). Se evaluó la pérdida de peso fresco y la concentración de gases en la atmósfera al interior de la bolsa. La pérdida de peso fresco se determinó de igual manera que en el Ensayo 1. La unidad experimental se definió como una bolsa conteniendo 4 frutos del mismo estado de madurez, que fue sellada herméticamente y con dimensiones de 20 cm de ancho por 20 cm de alto (Figura 2-2).

Concentraciones de CO₂ y etileno

Diariamente se analizaron por cromatografía de gases muestras de la atmósfera al interior de la unidad experimental (espacio de cabeza al interior de la bolsa) que eran extraídas con una jeringa a través de un septo de silicona adherido previamente sobre el empaque. El análisis de estas muestras se llevó a cabo en el mismo equipo y con idénticas condiciones de corrida que el Ensayo 1. Las concentraciones de los gases se cuantificaron de manera semejante que en el experimento uno, a partir de los cromatogramas y las curvas de calibración, y los resultados se expresaron como porcentaje de CO₂ y partes por millón (ppm) de etileno.

2.3 Parámetros bioquímicos y fisicoquímicos

Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Para estas determinaciones, la unidad experimental se definió como una bolsa con 4 frutos del mismo estado de madurez que fue sellada con calor y almacenada en las condiciones de temperatura ya indicadas al inicio. Se evaluaron dos estados de madurez de gulupa (50 y 75%), mediante un diseño factorial completamente al azar, con los factores temperatura y empaque, según los niveles ya indicados en el numeral 2.1.

Cada tercer día después del inicio del almacenamiento, se realizaron determinaciones por triplicado de cada tratamiento en cáscara y en pulpa. De manera que de cada unidad experimental se separó el pericarpo del fruto (que se denominará cáscara en adelante) y se maceró en nitrógeno líquido, y la pulpa se homogenizó separándola de las semillas con un tamiz. Cada tejido (cáscara y pulpa) se rotuló y se preservó congelado a -80°C hasta el momento de realizar los análisis.

En el día inicial del experimento (denominado: Día cero), antes de aplicar los tratamientos para cada estado de madurez, se separaron 3 grupos (triplicado) de 4 frutos cada uno y se realizaron las determinaciones para conocer las condiciones iniciales de las que partían los frutos.

2.3.1 Parámetros bioquímicos

Azúcares y ácidos orgánicos

La determinación y cuantificación en pulpa de gulupa del contenido de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido oxálico y ácido málico) y de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa), fue realizada por cromatografía líquida de alta eficiencia de intercambio iónico (Waters®) según adecuación de metodologías de (Chinnici *et al.* 2005, Gallander 1985). El equipo y los protocolos para la determinación y cuantificación, fueron suministrados por el Laboratorio de Investigación en Fisiología y Bioquímica Vegetal del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá.

Las extracciones de azúcares y ácidos se realizaron a partir de 2 g de pulpa fresca, que fueron pesados con balanza analítica (Ohaus) en un tubo de reacción de 15 ml, realizando duplicados para ácidos y para azúcares por cada unidad experimental. Sobre la pulpa se adicionaron 12 ml de extractante, que fue agua Tipo I en el caso de azúcares, y ácido fosfórico (5 mM) en el caso de ácidos. Se homogenizó en vortex (2 min), seguido de agitación horizontal (15 min) en cama de hielo, luego de lo cual se centrifugó a 6000 rpm a 12°C (30 min). Posteriormente se retiró el sobrenadante, que constituyó el extracto, y se filtró en un tambor de 0,20 µm y el filtrado fue recogido en un vial que se rotuló para la determinación por HPLC. En el caso de azúcares, se realizó un segundo filtrado a través de un cartucho de extracción en fase sólida C18 previamente activado (con metanol grado HPLC y purgado con agua Tipo I). Durante la extracción se mantuvieron los extractos en cama de hielo y en el caso de ácidos orgánicos se tuvo la precaución de cubrir los tubos con papel aluminio y mantener condiciones de oscuridad durante la extracción para evitar la degradación de los ácidos dada su fotolabilidad.

Para cuantificar azúcares se empleó una columna de intercambio iónico RCM-Monosaccharide Ca⁺² Phenomenex®, con condiciones de temperatura del horno de 85°C, con agua Tipo I como fase móvil a un flujo de 0,6 mL/min, presión de 276 psi, y un detector de índice de refracción (RI) 44°C. Para cuantificar ácidos orgánicos se empleó una columna ROA Acid Organic Phenomenex®, con ácido fosfórico 5mM como fase móvil a un flujo de 0,3 mL/min, presión de trabajo a temperatura ambiente entre 300 y 350 psi, y se empleó detector PDA, con lectura de absorbancia de $\lambda=242$ nm para el ácido ascórbico y de $\lambda=207$ nm para los demás ácidos. El tiempo de corrida fue de 20 y 35 minutos para azúcares y ácidos, respectivamente. Para la cuantificación se realizaron

previamente curvas de calibración con patrones de concentración conocida de cada uno de estos compuestos y para el cálculo de las concentraciones de las muestras se partió del área bajo la curva de los picos del cromatograma.

Polifenoles

En cáscara y pulpa de frutos de gulupa, el contenido total de polifenoles fue estimado como equivalentes de ácido gálico, según modificación realizada al procedimiento descrito por Škerget *et al.* (2005). La extracción se realizó a partir de 250 mg de peso fresco de tejido, sobre los cuales se adicionaron 4 mL de metanol (80% v/v), se homogenizó en vortex (1 min) y se llevó a agitación horizontal sobre cama de hielo (1 h), luego de lo cual se centrifugó a 6000 rpm a 4°C (1 h). Del sobrenadante (extracto metanólico) se transfirió una alícuota de 500 µL a un microtubo, al que se le adicionaron 400 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (2 N). Después de 15 min, se añadieron 50 µL de una solución de Na₂CO₃ (200 g/L) y 50 µL de agua destilada hasta completar volumen de 1 mL. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente y en oscuridad, se tomaron alícuotas, se leyó la absorbancia a $\lambda=760$ nm en equipo de microplacas (BioRad, Hercules, USA) contra blanco de reactivos y se comparó con una curva de calibración realizada con ácido gálico (n=3), expresando el contenido de polifenoles como mg polifenoles totales / 100 g tejido fresco.

Para preparar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0,1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0 µL a 160 µL en intervalos de 20 µL y se completó el volumen de cada uno a 500 µL con agua destilada. Luego, se adicionaron 400 uL del reactivo Folin-Ciocalteu, y después de 15 min, se añadieron 50 uL de una solución de Na₂CO₃ (200 g/L en agua destilada) y 50 uL de agua destilada hasta completar volumen de 1 mL. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente y en oscuridad, se tomaron alícuotas y se determinó la absorbancia a 760 nm, contra blanco de reactivos (n=3) en equipo de microplacas (BioRad, Hercules, USA).

Proteínas

Las proteínas totales de la cáscara y pulpa de los frutos de gulupa fueron determinadas y cuantificadas por el método de Bradford (1976) modificado por Zor & Selinger (1996).

Para la extracción de proteínas, se pesaron 150 mg de tejido vegetal en un tubo de reacción de 15 ml, y se adicionó 5,0 mL de solución amortiguadora de extracción fosfato

de sodio (50 mM, 3 % PVP-40 (p/v) pH 6,80). Se agitó en vórtex (1 min) y en agitador horizontal a 170 rpm (1 h) manteniendo en cama de hielo. Finalmente se centrifugó a 10000 rpm a 4°C (30 min), y el sobrenadante constituyó el extracto proteico que se empleó posteriormente para la cuantificación de proteínas y para la determinación de las actividades enzimáticas de catalasa y peroxidasa, por triplicado.

En un tubo de reacción se adicionaron 150 µL de solución amortiguadora y 225 µL de extracto, se agitó y se adicionaron 800 µL del reactivo de Bradford del Kit Bradford Bio-Rad Protein Assay diluido, se agitó y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se leyó la absorbancia a $\lambda=595$ nm de la muestra contra el blanco de reactivos. La curva de calibración para proteínas se realizó según (Moreno *et al.* 2010).

Actividad peroxidasa

La actividad de la enzima peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7) fue determinada en cáscara y pulpa de frutos de gulupa, mediante el método modificado de o-dianisidina/peróxido (Dalisay & Kúc 1995, Kireyko *et al.* 2006). De manera que en una celda de cuarzo se adicionaron 600 µL de solución amortiguadora fosfato de sodio (50 mM pH 6,70), 20 µL de o-dianisidina, 25 µL de extracto proteico y 40 µL de peróxido de hidrógeno 0,1% (v/v), se invirtió tres veces, y se realizó lectura de cinética de absorbancia a $\lambda=436$ nm (SmartSpec 3000, BIORAD®) durante 60 segundos leído contra blanco de reactivos. Se calculó la pendiente de la curva obtenida como $\Delta \text{Abs}_{436\text{nm}} / \Delta \text{segundo}$, a partir de la cual se calculó la actividad enzimática de POD como $\Delta \text{Abs}_{436\text{nm}} / (\text{minutos} \cdot \text{g de peso fresco})$.

Actividad catalasa

La actividad de la enzima catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) fue determinada en cáscara y pulpa mediante el método modificado de permanganato/peróxido (Aebi 1974) y la cuantificación se realizó por titulación con permanganato, previamente estandarizado con oxalato de potasio (sextuplicado). Esta determinación se realizó a partir 250 µL de extracto proteico, siguiendo la metodología descrita por Moreno *et al.* (2010). La actividad de CAT se determinó como milimoles de H₂O₂ descompuesto por minuto por gramos de tejido fresco.

Actividad poligalacturonasa

La extracción y actividad de la poligalacturonasa (PG; EC 3.2.2.15) en la cáscara y la pulpa de frutos de gulupa, se realizó siguiendo las metodologías propuestas por Sakai *et al.* (1993), Shen *et al.* (1996), Ceci & Lozano (1998) y Ortega *et al.* (2004). La actividad de esta enzima se expresó como actividad (μg de glucosa por minuto) por gramos de tejido fresco. Para esta determinación se requirió determinar el contenido de azúcares reductores mediante el método de Somogyi (1952)-Nelson (1944), los cuales fueron cuantificados espectrofotométricamente. Entonces la actividad de la PG se calculó a partir de la diferencia entre la concentración de azúcares reductores iniciales y finales después de la acción de la enzima por 60 minutos.

Sobre 500 mg de tejido fresco, se agregaron 4,5 mL de buffer acetato de sodio (acetato de sodio 50 mM, PMSF 2mM, ajuste de pH a 4,6). Se agitó en vortex (1 min) y en agitador horizontal en cama de hielo (1h), luego de lo cual se centrifugó a 6000 rpm a 4°C (30 min). El sobrenadante constituyó el extracto enzimático, que se empleó para calcular la actividad de PG. Adicionalmente se calculó el contenido de azúcares reductores iniciales en este sobrenadante.

Para el desarrollo de la reacción de la PG, en un tubo de reacción se agregó 1 mL de ácido poligalacturónico (disuelto en buffer acetato de sodio 100 mM, pH 4,2) y 500 μL de extracto enzimático, se incubó a 30°C (60 min exactos) y se detuvo la reacción adicionando 500 μL de acetato de calcio (75 mM pH 4,2). Inmediatamente se determinó el contenido de azúcares reductores en este medio de reacción de PG, mediante el método de Somogyi-Nelson (con tres repeticiones).

Para la determinación de azúcares reductores iniciales, en un tubo de reacción de 2,0 mL se adicionaron 70 μL del acetato de sodio (50 mM pH 4,6), 200 μL del sobrenadante, 250 μL de Somogyi I y 50 μL de Somogyi II. Se calentó en agua en ebullición (1 h), y se dejó enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad, luego de lo cual se agregaron 500 μL de reactivo de Nelson y 500 μL de agua destilada. Después de dejar reposar por una noche, se leyó la absorbancia a $\lambda=660$ nm contra blanco de reactivos. La determinación de azúcares reductores finales después de la reacción de la PG y en el blanco se realizó de igual manera pero reemplazando los 200 μL del sobrenadante por el mismo volumen

de medio de reacción de PG, y para el blanco reemplazándolos por buffer. La curva de calibración para azúcares reductores se realizó según Moreno *et al.* (2010).

2.3.2 Parámetros fisicoquímicos

Se determinaron en frutos empacados en Control, bajo los tres niveles de temperatura y con los dos estados de madurez ya indicados en el numeral 2.1.

Color

El cambio de la coloración externa de la cáscara se midió mediante colorímetro (MiniScan EZ, HunterLab®), utilizando como sistema de coordenadas L*C*h (luminosidad, saturación y tono, respectivamente). Se obtuvo como el promedio de 8 determinaciones en cada unidad experimental, que consistieron en dos mediciones por fruto sobre el diámetro ecuatorial.

pH

El pH se determinó sobre el extracto de pulpa mediante un potenciómetro (CG820, SCHOTT®) con electrodo de vidrio previamente calibrado. Se midió por triplicado en cada unidad experimental.

Acidez total titulable (ATT)

Una muestra de pulpa fue titulada con NaOH (0.1 N) y se midió la evolución de la reacción de neutralización con fenolftaleína, por triplicado para cada unidad experimental. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido cítrico, dado que se encontró que este ácido es el de mayor concentración en la pulpa del fruto de gulupa. Previo a su utilización, el NaOH fue estandarizado por sextuplicado con biftalato ácido de potasio para determinar su concentración exacta y con esta se realizaron los cálculos.

Sólidos solubles totales (SST)

Se cuantificaron por refractometría de la pulpa utilizando un refractómetro digital (HI96802, HANNA®) en unidades de grados Brix (°Brix), que fue previamente calibrado con agua destilada. Se midió por triplicado en cada unidad experimental.

Índice de Madurez (IM)

Se calculó como la relación SST/ATT, a partir del promedio de los triplicados de SST sobre el promedio de los triplicados de ATT para cada unidad experimental.

2.4 Análisis estadístico

Para los parámetros bioquímicos y fisicoquímicos, se realizaron análisis de varianza factoriales en Minitab 14, empleando el modelo GLM para establecer si existían diferencias significativas, con el 95% de confianza, debidas a las temperaturas de almacenamiento, a los estados de madurez y a los empaques. Cuando se encontraron diferencias debidas a los tratamientos, se realizaron comparaciones de medias por el método de LSD de Fisher, con el uso del Software libre R.

Las gráficas se realizaron empleando el programa Minitab 14.

3.Resultados y discusión

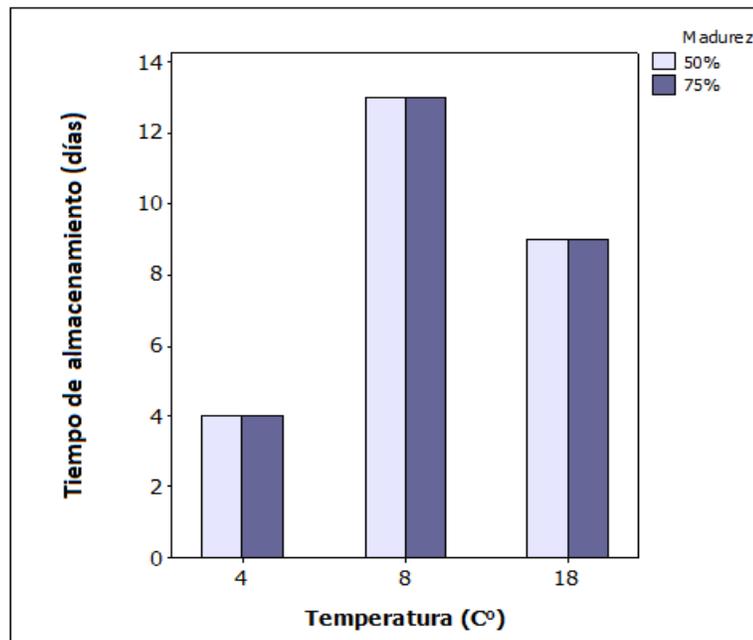
La vida posrecolección de los frutos de gulupa, establecida como el período de tiempo durante el cual los frutos mantienen una buena apariencia externa de la cáscara que les confiere una calidad adecuada, alcanzó 9 días en condiciones de almacenamiento sin empaque y a temperatura ambiental, en tanto que a 8°C se incrementó a 13 días, y a 4°C fue de apenas 4 días, debido al rápido arrugamiento presentado en esta baja temperatura posiblemente como respuesta al daño por frío (Figura 3-1). De esta manera entonces, el efecto de las bajas temperaturas en estas condiciones sin empaque, fue de prolongar la vida posrecolección en casi un 50% a 8°C, pero en el caso de 4°C su efecto fue deletéreo, ya que incluso redujo a la mitad de la vida posrecolección del fruto respecto al observado a temperatura ambiente, constituyéndose entonces en una temperatura en la cual se ocasionan daños por frío en los frutos de gulupa, considerando que se ha reportado que la reducción de la vida útil de los frutos es una manifestación del daño por frío (Sivakumar *et al.* 2011).

Adicionalmente, Arjona (1990) ha reportado para maracuyá, que los frutos almacenados a 5°C perdieron peso rápidamente, de manera que a los dos 2 o 3 días de almacenamiento ya tenían 60-80% de la cáscara arrugada y a los 15 días más del 80%, en tanto que los frutos almacenados a 10°C y 15°C tenían a los 15 días el 40% y 50% y a los 30 días el 65% y 80% de cáscara arrugada, respectivamente. Por lo cual este autor indica que el rápido deterioro de la apariencia externa de los frutos a 5°C y 15°C hace que no se recomiende el uso de estas temperaturas para el almacenamiento del fruto de maracuyá, pudiéndose entonces almacenar a 10°C hasta por 15 días, luego de la cual la apariencia los hace no comercializables. Y acorde con estos resultados, en la presente investigación se encontró de manera semejante que los frutos de gulupa sin empaque la temperatura que más prolongó la vida posrecolección fue 8 ± 2 °C, encontrándose la menor la vida posrecolección a 4°C seguida por 18°C.

Con el uso de empaques, se evidenció un efecto sinérgico de las bajas temperaturas sobre la prolongación de la vida posrecolección, sin ser afectada por los estados de madurez. En los frutos empacados en Control y Makropol M, se observó incremento de la vida posrecolección en los frutos a 4°C y 8°C respecto a aquellos a temperatura ambiente (Figura 3-2). Con el uso del empaque Control se prolongó la vida posrecolección en por lo menos el doble de tiempo cuando se emplearon bajas temperaturas, encontrándose que en promedio a 4°C fue mayor que a 8°C, siendo respectivamente de 4 y de 2-3 veces el tiempo en relación al alcanzado a temperatura ambiente en el mismo empaque. En tanto que con el uso del empaque Makropol M se incrementó la vida posrecolección del fruto incluso en condiciones de temperatura ambiente, alcanzando 15 a 18 días, tiempo que se duplicó con el uso de la refrigeración alcanzando hasta 33 días de almacenamiento tanto a 4°C como a 8°C (Figura 3-2).

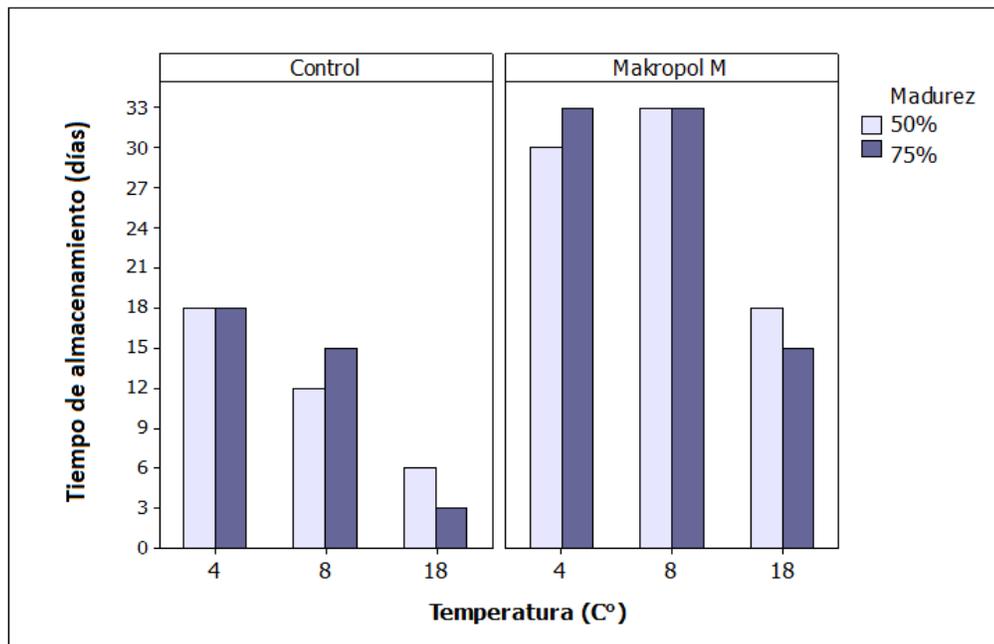
Además se evidenció que el uso de empaque protege al fruto de gulupa de desarrollar daño por frío, dado que no se encontró la reducción de la vida posrecolección detectada en los frutos sin empaque a 4°C (Figuras 3-1 y 3-2).

Figura 3-1: Vida posrecolección de los frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) en condiciones sin empaque a bajas temperaturas (4±2°C y 8±2°C) y temperatura ambiente (18±2°C).



Kishore *et al.* (2011) han reportado que durante el almacenamiento de frutos de gulupa a 4 temperaturas (ambiente, 6, 8 y 11°C), se encontró que la calidad del fruto se pierde rápidamente a los 5 días cuando está almacenado a temperatura ambiente, pero que a 8°C la calidad se mantiene adecuada hasta por 21 días, de manera que estos autores recomiendan la temperatura de almacenamiento a 8°C para la gulupa, dado el mantenimiento satisfactorio de su calidad sensorial. Lo cual es consistente con los resultados obtenidos, en los que la calidad indicada como la apariencia externa de la cáscara se pierde rápidamente en los frutos a temperatura ambiental y a 8°C se preserva por más tiempo dicha calidad, y en el caso del uso concomitante de empaques se obtienen resultados similares a 4°C que a 8°C.

Figura 3-2: Vida posrecolección de los frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) a bajas temperaturas ($4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$) y a temperatura ambiente ($18\pm 2^\circ\text{C}$), en los empaques Control y Makropol M.



Respecto al criterio de una aceptable apariencia externa de la cáscara, elegido para establecer el periodo de vida posrecolección del fruto de gulupa, se ha reportado para maracuyá, que la apariencia externa del fruto es un importante índice de calidad, puesto que la cáscara se deshidrata rápidamente después de la abscisión, entonces la

aparición externa es un criterio muy importante a considerar cuando el fruto se comercializa como fresco, puesto que a pesar de que la calidad del jugo se mantiene adecuada en el maracuyá, la presencia de arrugas lo hacen no comercializable (Arjona 1990). Lo cual puede aplicarse para la gulupa, dado que es un fruto cuya principal forma de comercialización para el mercado de exportación en Colombia, es en estado fresco.

3.1 Parámetros fisiológicos

3.1.1 Pérdida de peso fresco

En los frutos de gulupa, se observó que la pérdida de peso fresco acumulada se incrementó proporcionalmente con el transcurso del tiempo de almacenamiento, y que en general no hubo diferencias significativas entre los estados de madurez evaluados (Figura 3-3).

En los frutos sin empaque, aquellos almacenados a temperatura ambiente (18°C) fueron los que mayores pérdidas de peso presentaron, con una tasa diaria del 1,56% (Figura 3-1). En estas condiciones, sin empaque, se encontró que la refrigeración disminuyó la tasa de pérdida de peso, de manera que los frutos a 8°C presentaron menor pérdida de peso diaria respecto a los de 4°C, siendo respectivamente 0,35 y 0,92% (Figura 3-4, Anexo A).

Con respecto a los frutos de gulupa almacenados con empaques, los resultados del comportamiento de este parámetro fueron semejantes a aquellos sin empaque en cuanto a que no hubo efecto de los estados de madurez, y a que la mayor pérdida de peso se registró en los frutos almacenados a temperatura ambiente (Figura 3-5). En condiciones de temperatura ambiente, la pérdida de peso fue superior en los frutos sin empaque respecto a los empacados, que tuvieron una tasa diaria de 0,69% y 0,10% en Control y Makropol M respectivamente (Figuras 3-3 y 3-5, Anexo A). Martínez (2010) reportó que los frutos de gulupa almacenados a 8°C sin empaque perdieron a la cuarta semana de almacenamiento entre el 6-7% de peso, teniendo una tasa diaria de pérdida de peso en torno a 0,2%, resultados similares a los obtenidos.

Figura 3-3: Promedios del porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) almacenados sin empaque en condiciones de temperatura ambiente ($18\pm 2^\circ\text{C}$). Barras indican error estándar ($n=3$).

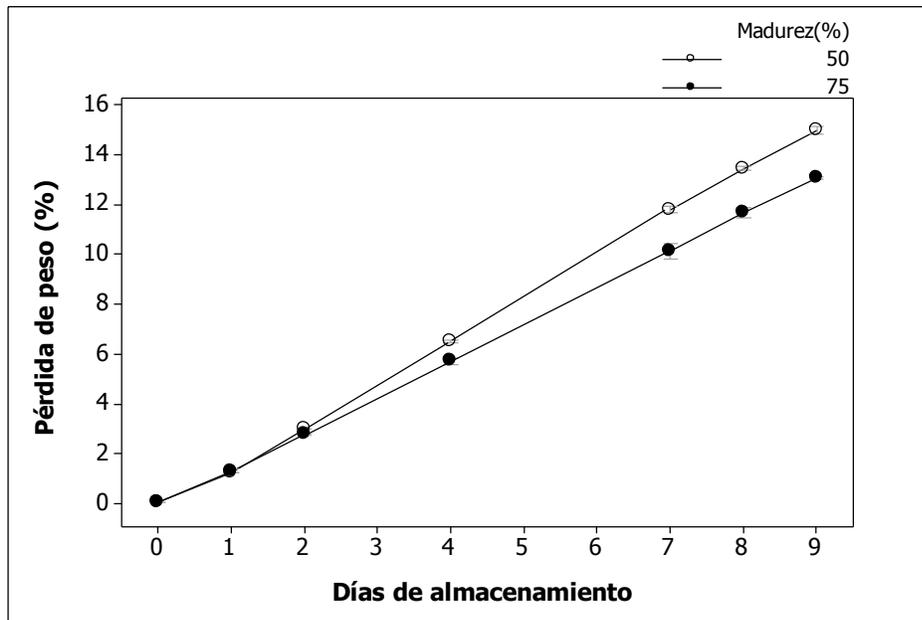
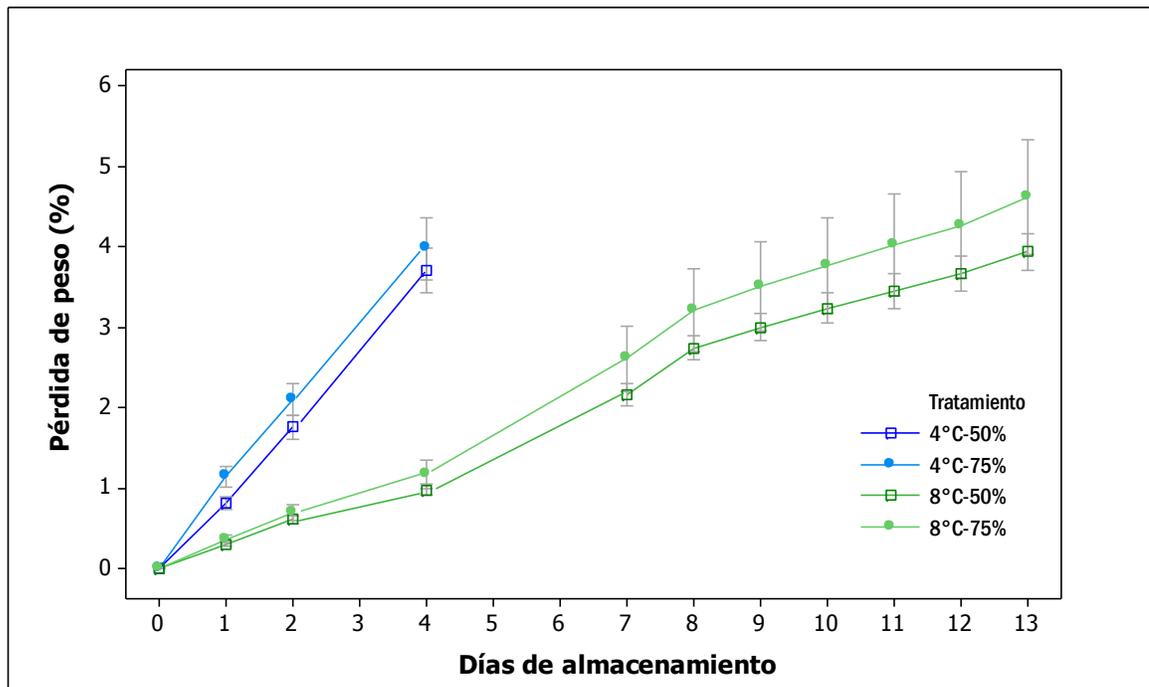


Figura 3-4: Promedios del porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) almacenados sin empaque y a bajas temperaturas ($4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$). Barras indican error estándar ($n=3$).



Y adicionalmente, en los frutos empacados se evidenció la disminución de la pérdida de peso con la reducción en la temperatura de almacenamiento, en contraste con lo observado en los frutos sin empaque. De manera que a 4°C presentaron una tasa diaria de pérdida de peso que fue alrededor de la mitad de la de los frutos a 8°C, siendo respectivamente de 0,12% y 0,26% en Control y de 0,02% y 0,05% en Makropol M (Figuras 3-4, 3-5 y 3-6, Anexo A). Observándose un efecto significativo debido al tipo de empaque, encontrándose menores pérdidas de peso fresco en los frutos almacenados en Makropol M con respecto al Control, para todas las temperaturas (Figuras 3-5 y 3-6).

Los anteriores resultados del incremento de la pérdida de peso fresco con el transcurso del tiempo, son similares a los reportados en diferentes estados de madurez de gulupa (Shiomi *et al.* 1996b) y en frutos de maracuyá (Aular *et al.* 2001, Espinoza *et al.* 2008), en donde con el aumento del tiempo de almacenamiento se incrementó la pérdida de masa. Aular *et al.* (2001) encontró que en los frutos de maracuyá almacenados en condiciones ambientales sin empaque y con temperatura promedio de $24\pm 4^{\circ}\text{C}$, la pérdida de peso acumulada fue del 16.77% en el día 12 y de 21.85% al cabo de 15 días.

El incremento de pérdida de peso con el aumento en la temperatura de almacenamiento observado, se debe a que las altas temperaturas aceleran el metabolismo de los frutos, incrementándose la respiración y transpiración, lo cual ocasiona una mayor pérdida de agua, y por consiguiente mayor pérdida de peso. Un comportamiento semejante al encontrado ya ha sido reportado por Gómez (2000) en maracuyá, en donde con temperaturas de almacenamiento de 25°C la pérdida de peso fue hasta 5 veces mayor que con temperatura de 12°C, y para la gulupa por Kishore *et al.* (2011), quienes reportaron que durante el almacenamiento de frutos de gulupa a cuatro temperaturas (ambiente, 6°C, 8°C y 11°C), se encontró que la tasa de pérdida fisiológica de peso se incrementó con el aumento de la temperatura de almacenamiento. Además, esto se debe también a que a mayores temperaturas se requiere mayor humedad para saturar el aire, entonces esto ocasiona una mayor diferencia de presión de vapor entre el fruto y la atmósfera de almacenamiento lo cual conlleva a una rápida pérdida de humedad del fruto hacia el ambiente, como se ha reportado en frutos de litchi (Somboonkaew & Terry 2010).

Figura 3-5: Porcentaje promedio de pérdida de peso fresco acumulado, en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) durante el almacenamiento a temperatura ambiente ($18\pm 2^\circ\text{C}$) en los empaques Control y Makropol M. Barras indican error estándar ($n=3$).

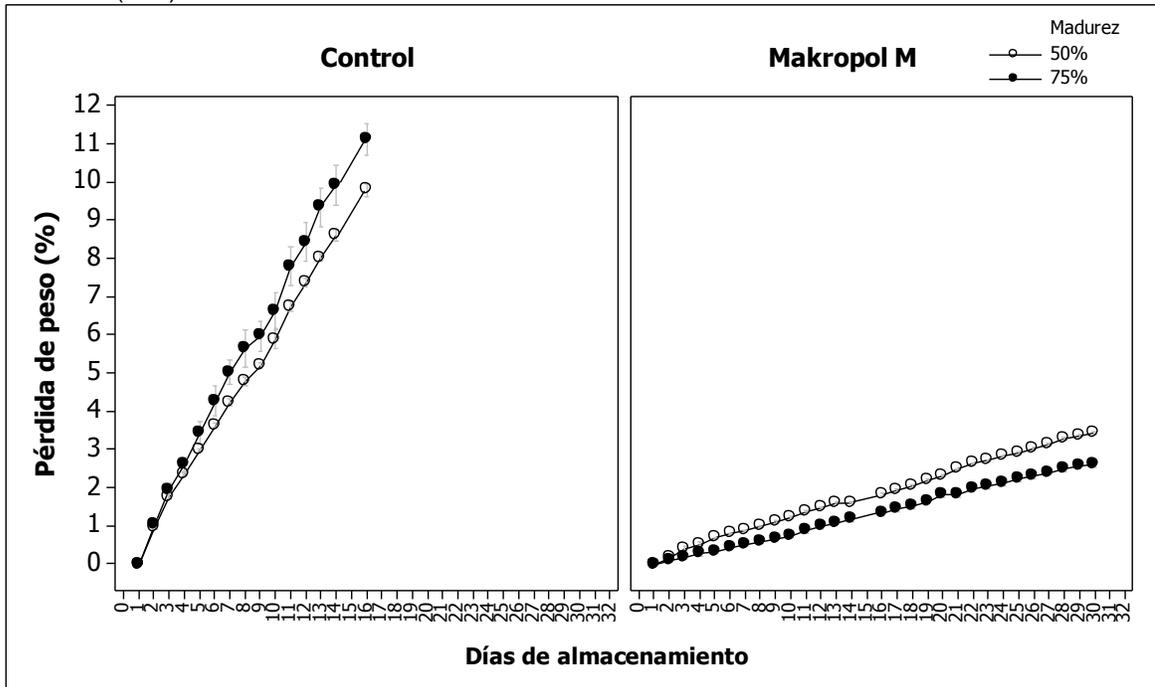
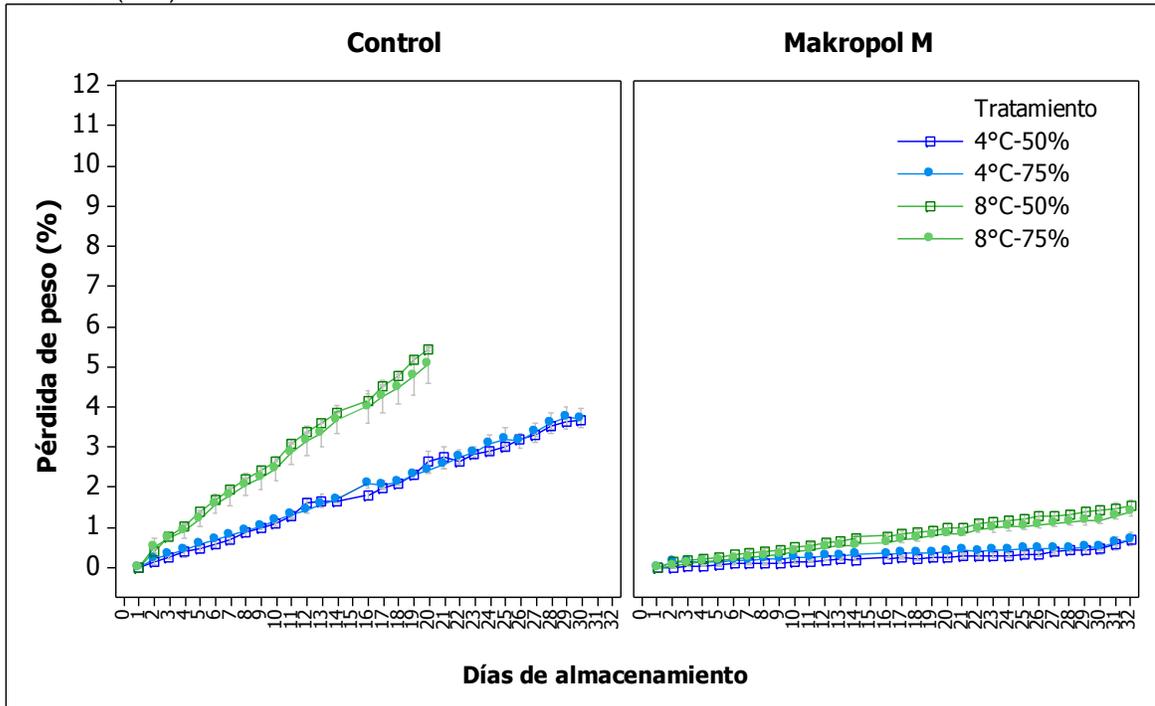


Figura 3-6: Porcentaje promedio de pérdida de peso fresco acumulado, en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) durante el almacenamiento a bajas temperaturas ($4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$) en los empaques Control y Makropol M. Barras indican error estándar ($n=3$).



El efecto retardante de los empaques de polietileno sobre la pérdida de peso durante el almacenamiento, ya ha sido reportado en frutos de maracuyá (Aular *et al.* 2001, Espinoza *et al.* 2008). Aular *et al.* (2001), observaron que con empaque de polietileno de baja densidad, al cabo de 15 días los frutos perdieron 1,46% de su peso inicial en comparación con los frutos testigo sin empaque que perdieron el 21,85% del peso, lo que es consistente con los resultados del presente estudio, dado que Makropol M tiene base en polietileno de baja densidad. Esta mayor eficiencia de los empaques para reducir la pérdida de peso de los frutos también ha sido reportada por Mota *et al.* (2003) durante el almacenamiento en polipropileno de baja densidad de frutos de maracuyá, y por Martínez (2010) en frutos de gulupa almacenados en Makropol M, quienes indican que esto es debido a la baja permeabilidad del empaque al vapor de agua, durante el inicio del almacenamiento, debido a que se crea al interior del empaque una atmósfera saturada de vapor de agua por la transpiración de los frutos, lo cual conlleva a que se reduzca el gradiente de presión de vapor entre el fruto y dicha atmósfera y por consiguiente se reduzca la transpiración y la consecuente deshidratación del fruto de gulupa. Ben-Yehoshua & Rodov (2003) reportan que la excesiva transpiración, puede ocasionar deshidratación, arrugamiento, reducción de la firmeza y promueve la senescencia al disminuir los procesos enzimáticos endógenos, lo cual podría explicar por qué en el ensayo realizado, los frutos empacados tuvieron una vida posrecolección más prolongada que los no empacados.

Mota *et al.* (2003) también señalan que el hecho de que los frutos de maracuyá empacados en películas plásticas permanezcan más turgentes, como se observó en el presente estudio en frutos de gulupa en donde se redujo el arrugamiento por deshidratación, evidencia que la pérdida de agua ocurre especialmente de la cáscara hacia el ambiente. Además estos autores corroboraron en maracuyá que la pérdida de peso en los primeros días de almacenamiento fue mayor en la cáscara mientras que paralelamente se incrementó la masa fresca de la pulpa, de manera que la transferencia de agua ocurrió de la cáscara hacia la atmósfera y hacia la pulpa en esos primeros 9 días, luego de lo cual, ya en el día nueve, la pérdida de agua hacia la atmósfera fue tanto de la cáscara como de la pulpa.

De manera semejante a lo observado en los resultados, se ha reportado en maracuyá, que la pérdida de peso se disminuye con la reducción en la temperatura de

almacenamiento, y con el uso de empaque, de manera que se ha encontrado que la condición que es más efectiva en retardar la pérdida de peso de éste fruto es el uso de empaque con película de polietileno junto con el almacenamiento a bajas temperaturas entre 10-12°C, la cual permite almacenar el fruto de maracuyá hasta por 30 días manteniendo calidad aceptable (Espinoza *et al.* 2008, Sáenz *et al.* 1991).

Se ha reportado en otros frutos tropicales como zuchinni (Carvajal *et al.* 2011) y carambola (Ali *et al.* 2004a) que durante el almacenamiento a temperaturas de 4-5°C se han observado mayores pérdidas de peso fresco con respecto a las presentadas en frutos almacenados a 10-12°C encontrando que en las primeras existen sintomatologías de daño por frío, en tanto que en las últimas no. Incluso el arrugamiento o marchitamiento debido a la pérdida de humedad ya ha sido indicado como un síntoma visible del daño por frío en *Capsicum annuum* (Sánchez-Bel *et al.* 2012). De hecho este desorden fisiológico puede ser indicador de daños subyacentes en las membranas (Ali *et al.* 2004a), y adicionalmente, esta disfunción de las membranas puede resultar en el incremento de la permeabilidad al agua, además de un posible efecto en la pérdida de compartimentalización subcelular, permitiendo entonces que las enzimas y sustratos secuestrados en ubicaciones separadas, se mezclen permitiendo reacciones de pardeamiento como los catalizadas por polifenoloxidasas (Ali *et al.* 2004a) y peroxidasa.

Adicionalmente, se observó que durante el almacenamiento de los frutos sin empaque a temperatura de 4°C, se desarrolló un aroma extraño que no es característico del fruto de gulupa, lo cual podría soportar el indicio de daño por frío en estos frutos, dado que ya se ha reportado que como consecuencia de dicho desorden fisiológico pueden presentarse olores no propios de la maduración normal de los frutos (Kader 1992).

Lo anterior indica que la presencia de empaque evita o retarda el daño por frío en el fruto de gulupa, lo cual ya ha sido reportado en mango por Pesis (2000), quien señala que el uso de atmósferas modificadas, entre ellas las obtenidas con empaques de polietileno, es efectivo en reducir los daños por frío. También se ha encontrado este efecto en *Cucumis sativus* con el uso de bolsas de polietileno de baja densidad, indicando que los elevados niveles de CO₂ y la alta humedad relativa cercana a la saturación dentro del empaque son los dos factores que aparentemente retardan el daño por frío (Wang & Qi 1997).

3.1.2 CO₂ y etileno

En los frutos de gulupa almacenados sin empaque, se encontró que la intensidad respiratoria fue significativamente mayor en aquellos a temperatura ambiente respecto a la de los frutos refrigerados (Figuras 3-7 y 3-8). En los frutos almacenados en condiciones ambientales de temperatura, se observó un incremento de la respiración entre los días 7 y 8, y un incremento en la producción de etileno en día 8, que fue en ambos casos mayor en los frutos con 50% de madurez respecto a aquellos con 75% de madurez, alcanzando respectivamente en promedio 2448,6 y 1983,9 mg de CO₂/kg*h y 66,5 y 17,4 μL de etileno/kg*h (Figura 3-7). De manera que la ocurrencia de un pico respiratorio y de producción de etileno, indica que los frutos de gulupa tienen una maduración de tipo climatérica, en la cual la maduración organoléptica está marcada por la producción de etileno y por el incremento de la respiración (Brummell & Harpster 2001). Este comportamiento climatérico ya ha sido reportado para los frutos de gulupa (Shiomi *et al.* 1996a, Flórez 2012, Martínez 2010).

Adicionalmente, los niveles de producción de CO₂ encontrados en estos frutos, son similares a los reportados por Flórez (2012) en frutos de gulupa (provenientes de Cundinamarca) durante el almacenamiento a temperatura ambiente, en los que el máximo respiratorio de frutos con 50% y 70% de madurez se encontró entre el día 7 a 10 después de la cosecha entre el rango de 2000-2500 mg de CO₂/kg*h, y el pico de producción de etileno ocurrió entre el día 14 y 18 con niveles que superaron los 300 μL de etileno/kg*h; sin embargo, Flórez (2012) encontró que la producción de CO₂ y de etileno es mayor con el incremento del estado de madurez, lo cual es contrario a lo encontrado, puesto que en el presente estudio fueron mayores en los frutos con 50% de madurez.

En el caso del etileno, en contraste con lo reportado por Flórez (2012), los niveles obtenidos durante el presente estudio fueron mucho menores, mientras que los picos de respiración y producción de etileno fueron coincidentes, lo cual además ha sido reportado por Díaz *et al.* (2012) indicando que en frutos de gulupa originarios de Boyacá, se presentaron picos coincidentes de respiración y producción de etileno en frutos almacenados a temperatura ambiente con madurez de 50% y 75%. En tanto que los bajos niveles de etileno, por su parte, son semejantes a los reportados por Shiomi *et al.*

(1996a) en gulupa, en donde encontraron niveles inferiores a $100 \mu\text{L}$ de etileno/ kg^*h en el día 10 de almacenamiento a 25°C y destacaron que durante la primera semana de almacenamiento los frutos presentaron bajos niveles de etileno, pero que el pico climatérico no se alcanzó antes de los 15 días de almacenamiento. Con este mismo estudio, Shiomi *et al.* (1996a), reportaron que para la maduración a 25°C durante la poscosecha de frutos de gulupa cosechados en estado verde maduro, el arilo y las semillas son las partes del fruto que más producen etileno, y en menor medida la cáscara. Además, en el arilo y las semillas, estos autores encontraron que el contenido de ACC y la actividad de la ACCsintetasa incrementaron concomitantemente con la producción de etileno durante la maduración poscosecha, y que la ACCoxidasa se incrementó con el transcurso del tiempo, indicando que dado a los altos niveles de ésta enzima, puede atribuirse la ACCoxidasa como la responsable de la alta producción de etileno durante la maduración poscosecha de los frutos de gulupa y que en este caso la enzima ACCsintetasa es el paso limitante de la reacción.

Figura 3-7: Respiración y producción de etileno en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) durante el almacenamiento a temperatura ambiente ($18\pm 2^\circ\text{C}$) y sin uso de empaque. Barras indican error estándar ($n=3$).

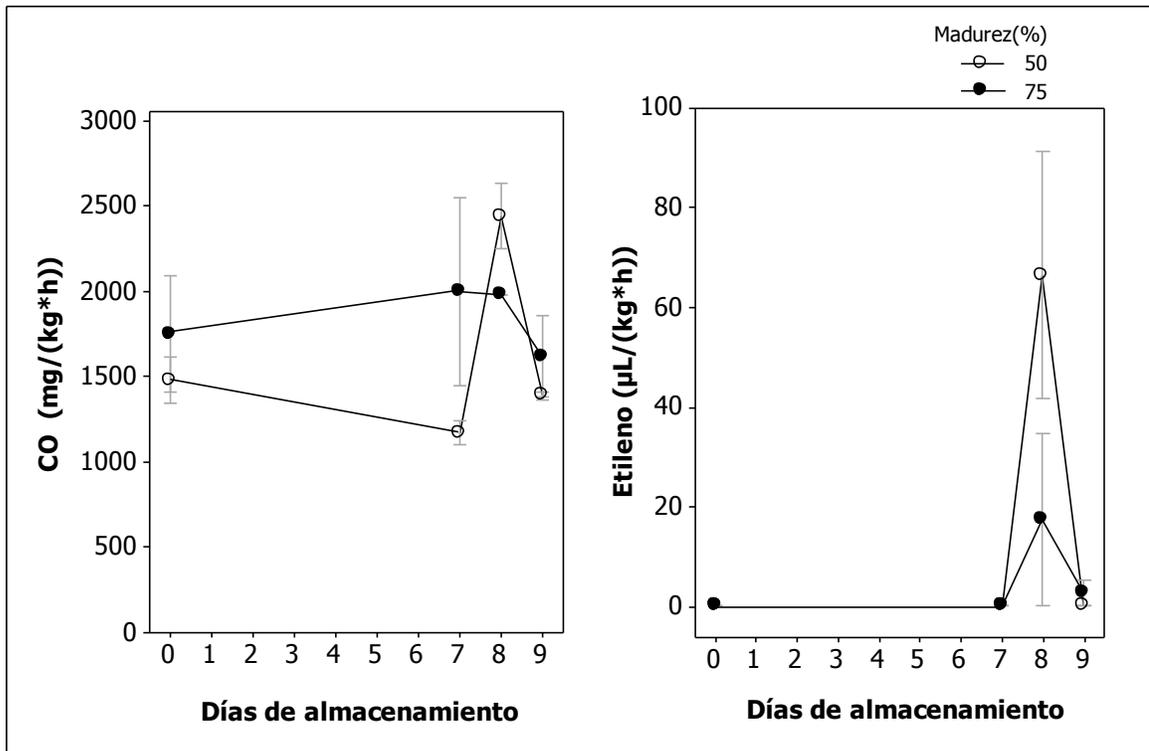
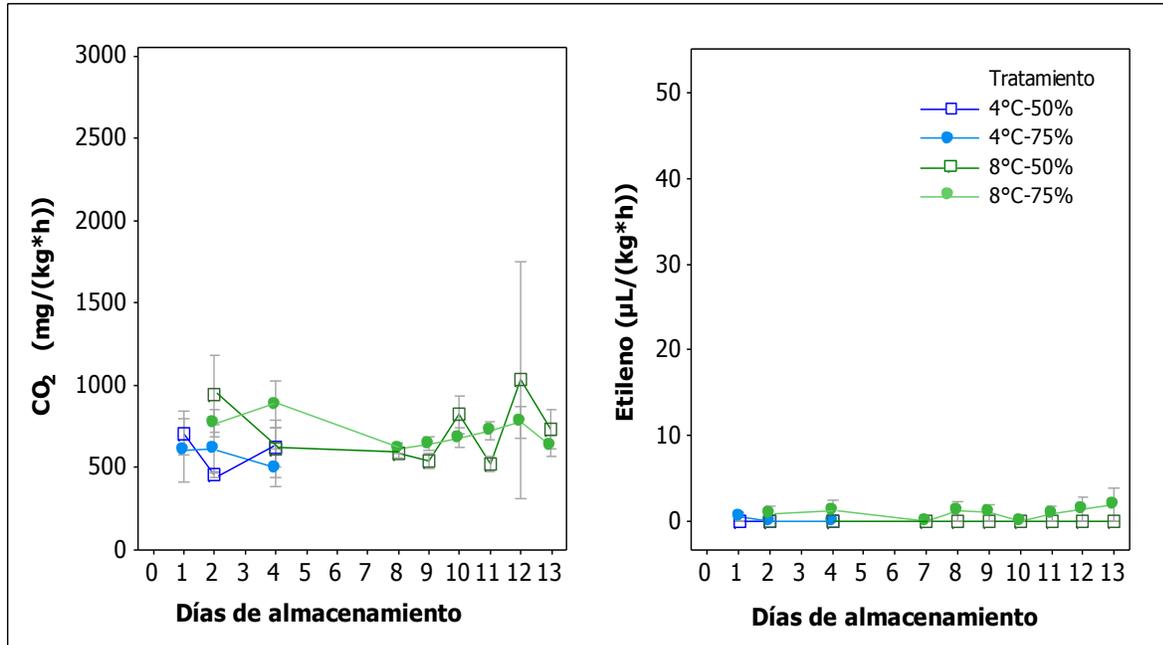


Figura 3-8: Respiración y producción de etileno en frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) durante el almacenamiento a bajas temperaturas ($4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$) y sin uso de empaque. Barras indican error estándar ($n=3$).



En otro estudio, Shiomi *et al.* (1996b) encontraron que los frutos de gulupa cosechados entre 70 y 90 días después de la floración presentaron incremento de los niveles de etileno con el transcurrir del tiempo de almacenamiento poscosecha (25°C) de manera que para el décimo día estaban entre $600\text{-}800 \mu\text{L}/\text{Kg}\cdot\text{h}$, y encontraron que los niveles de dióxido de carbono después de la cosecha se redujeron hasta el octavo día de almacenamiento, luego de lo cual empezaron a incrementar.

Esta presencia de un climaterio respiratorio y de etileno en los frutos de gulupa durante su maduración, los hace susceptibles a ser cosechados en estados fisiológicamente maduros, pero organoléptica o comercialmente inmaduros, de manera que se les pueden aplicar tecnologías poscosecha para prolongar su vida de anaquel, con las cuales estos picos de respiración y/o producción de etileno se retarden en el tiempo o se reduzcan en magnitud durante el período de transporte y almacenamiento.

Por su parte, en los frutos refrigerados almacenados sin empaque, aquellos a 4°C presentaron en promedio una intensidad respiratoria promedio de $581,8 \text{ mg de CO}_2/\text{kg}\cdot\text{h}$, sin diferencias debidas al estado de madurez, mientras que en los frutos almacenados a

8°C fue en promedio de 641,2 mg de CO₂/kg*h, destacándose que en los frutos con 50% de madurez se presentó un incremento en el día 12 de 1030,8 mg de CO₂/kg*h (Figura 3-8). Respecto al etileno en los frutos refrigerados, se observó que los niveles fueron menores que los encontrados a temperatura ambiente, de modo que en los frutos almacenados a 4°C en general no se detectó etileno, mientras que en los frutos a 8°C sólo fue detectado en una de las tres réplicas de los frutos con madurez del 75%, ocasionando que en este estado de madurez se alcancen niveles promedio de 1 µL de etileno/kg*h (Figura 3-8). De esta manera, se encontró entonces que con las bajas temperaturas (4°C y 8°C) se redujeron las tasas de respiración y la producción de etileno, siendo más marcadas estas reducciones en los frutos a 4°C, lo cual evidencia el efecto retardante de la maduración que tiene el uso de las bajas temperaturas en los frutos de gulupa.

Para verificar que el empaque Control no modificaba la atmósfera en torno al fruto, premisa por la cual se empleó como un control, se realizó un experimento confirmatorio (resultados no se muestran), y se comprobó que la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera al interior de éste empaque osciló entre no detectada y 0,09%, con promedio de 0,026% para los frutos en todos los tratamientos de madurez y temperatura, lo cual es muy cercano a la concentración de la atmósfera ambiental que es de 0.03% CO₂. Adicionalmente, el etileno en la atmósfera al interior de este mismo empaque no fue detectado en los frutos almacenados en refrigeración a 4°C y 8°C, y solo se detectó en aquellos frutos a temperatura ambiente durante los primeros 10 a 12 días en donde su concentración se mantuvo en torno a 1 parte por millón (ppm), encontrándose que a esta temperatura la producción de etileno fue mayor en los frutos de menor estado de madurez, con respecto a los 75%, alcanzando 3,2 y 1,7 µL por kilogramo de peso fresco de gulupa, respectivamente. De esta manera, se corroboró entonces que el uso de empaque Control no modificó significativamente la atmósfera al interior de la bolsa respecto a la ambiental.

Se encontró con el empaque Makropol M, que tanto la concentración de CO₂ como de etileno en el espacio de cabeza fue mayor en los frutos almacenados a temperatura ambiente respecto a los refrigerados (Figuras 3-9 y 3-10). En condiciones de temperatura ambiente, en la atmósfera al interior del empaque Makropol M, se observó que las concentraciones de CO₂ y de etileno se fueron reduciendo con el transcurso del tiempo

de almacenamiento, destacándose que en aquellos frutos con 50% de madurez, se presentaron en promedio menores concentraciones de CO₂ y etileno al interior de la bolsa respecto a los frutos de 75% de madurez (Figura 3-9). Mientras que en condiciones de refrigeración, no hubo efecto significativo del estado de madurez, y se observó que las concentraciones de CO₂ y de etileno en la atmósfera al interior del empaque Makropol M se equilibraron después de la primera semana de almacenamiento, de manera que se alcanzó un equilibrio en torno a 0,68±0,3 % de CO₂ para los frutos refrigerados a 4°C y 8°C en ambos estados de madurez, y un equilibrio en la concentración de etileno que fue significativamente mayor en los frutos a 8°C que a 4°C, siendo de 23,0±11,3 ppm y 3,7±4.3 ppm respectivamente (Figura 3-10).

Las mayores intensidades respiratorias observadas en los frutos a temperatura ambiente respecto a los refrigerados, en condición sin empaque, se deben a que a temperaturas menores se reduce la velocidad de la respiración, dado a que con las bajas temperaturas se reduce la velocidad con la que ocurren las reacciones enzimáticas y el metabolismo (Arjona 1990, Wills *et al.* 1998). Además, considerando que las tasas respiratorias son indicadoras de la tasa de rompimiento de los sustratos, los productos con altas tasas respiratorias maduran más rápidamente y en consecuencia tienen una vida útil más corta que aquellos con menores tasas respiratorias (Getinet *et al.* 2011), lo que explica el menor período de almacenamiento encontrado en los frutos de gulupa almacenados a temperatura ambiente respecto a los refrigerados.

En maracuyá, se ha reportado el efecto de las bajas temperaturas de reducir la tasa de respiración, es así que se han encontrado menores tasas con el almacenamiento a 10°C con respecto a temperatura ambiental (Gómez 2000).

Sevillano *et al.* (2009) han reportado que durante el almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas, el efecto del frío sobre la biosíntesis del etileno, ocurre en primera instancia por la reducción de la actividad de ACCoxidasa, lo cual conlleva a un decrecimiento de los niveles de ACC y por consiguiente la reducción de la síntesis de etileno durante el almacenamiento en frío es debido principalmente a la disminución de la síntesis de ACC, que es su precursor.

Figura 3-9: Evolución del CO₂ y del etileno en la atmósfera al interior del empaque Makropol M, durante el almacenamiento a temperatura ambiente (18±2°C) de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura). Barras indican error estándar (n=3).

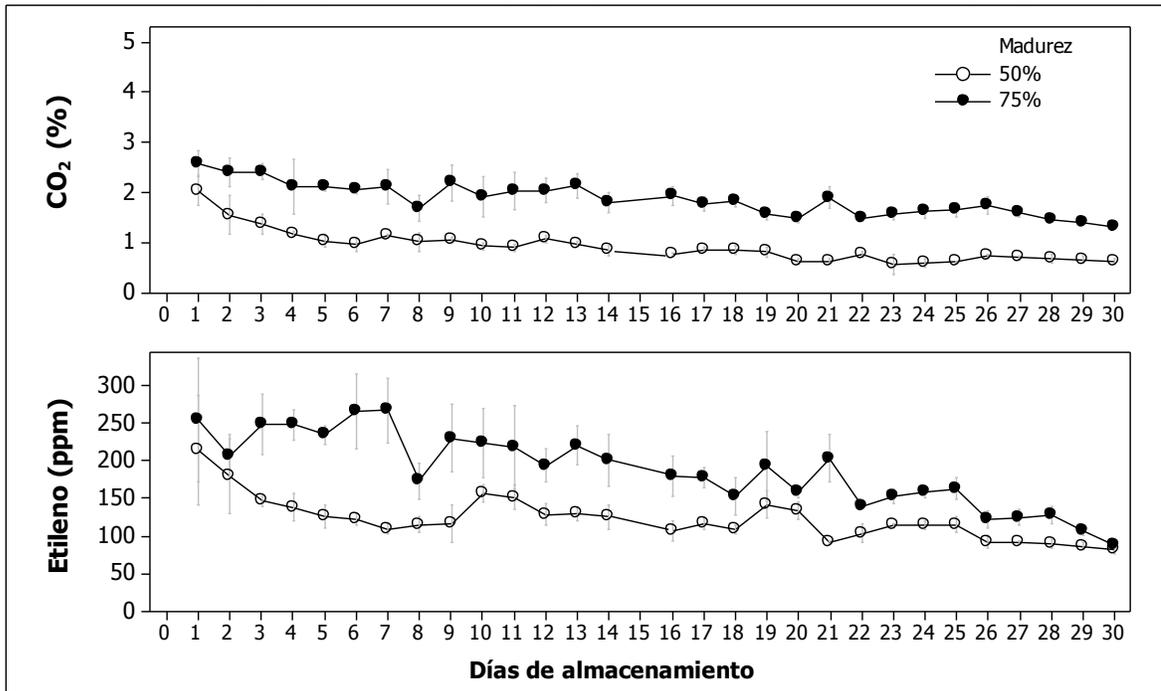
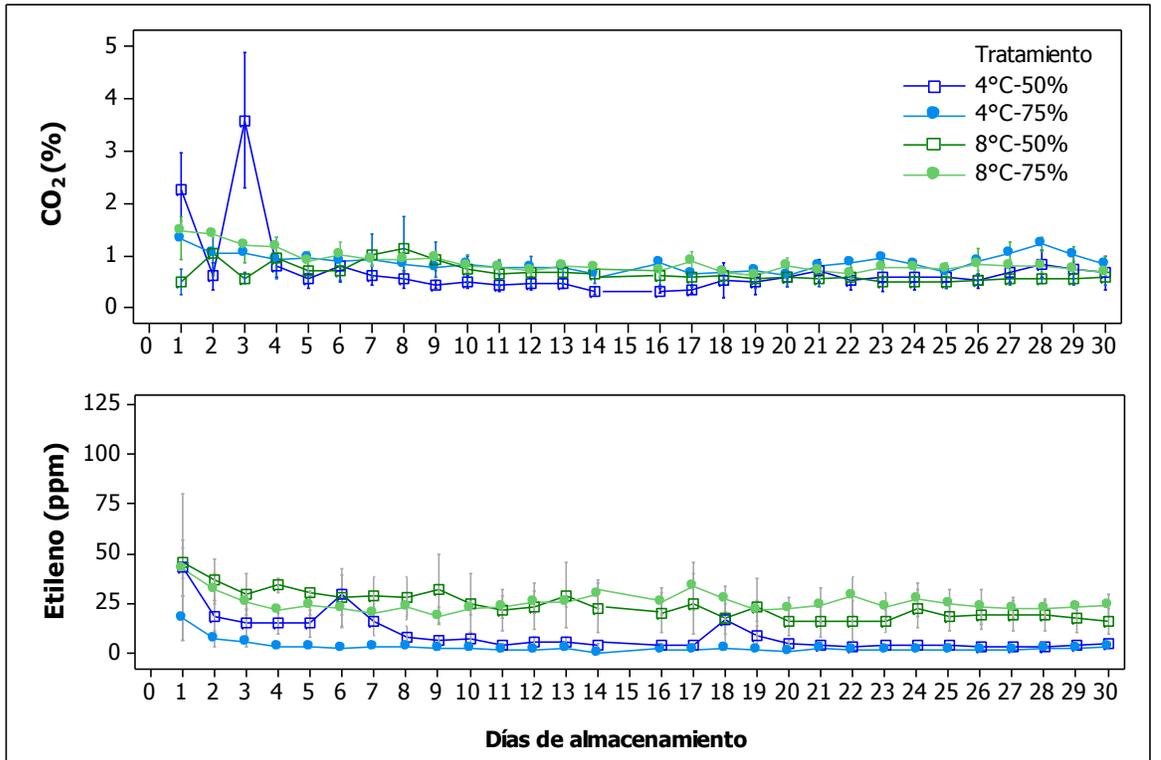


Figura 3-10: Evolución del CO₂ y del etileno en la atmósfera al interior del empaque Makropol M, durante el almacenamiento a bajas temperaturas (4±2°C y 8±2°C) de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura). Barras indican error estándar (n=3).



Durante el transcurso del almacenamiento de los frutos de gulupa en el empaque Makropol M, la concentración de CO₂ de la atmósfera al interior del empaque se redujo rápidamente en los primeros días hasta alcanzar un equilibrio, lo cual se debe a que durante el período de almacenamiento de los frutos, una vez el empaque es sellado, con el transcurso del tiempo ocurre una saturación en CO₂ y una reducción en la concentración de O₂ en el microambiente generado por el empaque, lo cual disminuye y controla la respiración de los frutos (Mota *et al.* 2003). Del mismo modo se crea un incremento de la humedad relativa. Una vez cerrada la bolsa, la respiración natural del fruto baja la concentración de oxígeno al interior del empaque resultando en un incremento de la concentración de dióxido de carbono. A medida que la concentración de oxígeno declina, el ritmo de la respiración del fruto decrece hasta que se alcanza un punto de equilibrio en el que la tasa de oxígeno captado y la producción de CO₂ por el fruto al interior de la bolsa iguala a la permeabilidad de O₂ y CO₂ de la misma. De esta manera se obtiene una atmósfera con mayor CO₂ el cual al actuar como inhibidor competitivo de la producción autocatalítica de etileno, puede bloquear la biosíntesis del etileno, retrasando por lo tanto el proceso de envejecimiento.

Considerando que la respiración puede emplearse como un indicador de la actividad metabólica en la fisiología del fruto (Arjona 1990), la reducción de la respiración encontrada con el empaque Makropol M, implica la disminución del metabolismo de los frutos de gulupa en este empaque, permitiendo que los cambios propios de la maduración, como lo es el cambio de coloración, se expresen lentamente, ocasionando el prolongamiento del período de almacenamiento de los frutos de gulupa.

Los cambios en la composición de gases en el almacenamiento bajo atmósferas modificadas y controladas pueden tener un efecto en la biosíntesis del etileno y de sus precursores. El oxígeno es un cosustrato de la enzima ACCoxidasa, lo que sugiere que las bajas concentraciones de O₂ reducen la producción de etileno debido a la reducción de la actividad de dicha enzima que participa en la biosíntesis del etileno. Cuando estos bajos niveles de O₂ se combinan con bajas temperaturas, se retarda la estimulación de las actividades de las enzimas ACCsintetasa y ACCoxidasa y la acumulación del mRNA correspondiente, retardado el inicio de la producción autocatalítica del etileno (Lelièvre *et al.* 1997). Los efectos de los bajos niveles de O₂ también reducen la expresión de genes etileno-independientes relacionados con la maduración (Lelièvre *et al.* 1997). En tanto

que a altas concentraciones, el CO₂ se convierte en inhibidor competitivo de la acción del etileno, el cual puede prevenir la producción autocatalítica de etileno al limitar la inducción de la actividad de ACCsintetasa y ACCoxidasa (Lelièvre *et al.* 1997). Lo anterior podría explicar por qué los frutos en empaque Makropol M no presentaron el pico de producción de etileno, dado que es un empaque con atmósfera modificada, con altos niveles de CO₂ y bajos de O₂, lo cual aunado con la propiedad antimaduración del empaque, que secuestra en la película polimérica las moléculas de etileno liberadas a la atmósfera, ocasiona la disminución de la producción de etileno.

La mayoría de los desórdenes fisiológicos poscosecha en los frutos climatéricos están influenciados, directa o indirectamente, por el etileno, numerosos reportes han demostrado que reducir la producción y/o acción del etileno es suficiente para mejorar la calidad poscosecha de la mayoría de los frutos climatéricos (Girardi *et al.* 2005). Esto puede explicar la prolongación del período de almacenamiento de los frutos de gulupa con el empaque Makropol M, debido a que proporciona una atmósfera modificada que reduce la producción de etileno, a lo que se suma que este empaque posee un aditivo retardante de la maduración, que interactúa con el etileno en la atmósfera interna del empaque.

3.2 Parámetros bioquímicos

A continuación se presentan los comportamientos de los parámetros bioquímicos evaluados durante el almacenamiento de los frutos de gulupa de 50% y 75% de madurez, en condiciones de temperatura ambiente (18°C) y refrigeración a 4°C y 8°C, con empaque Control y empaque Makropol M.

3.2.1 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son componentes importantes del fruto que influyen en gran medida, junto con los azúcares, el sabor de la gulupa y su calidad sensorial. En la pulpa de los frutos de gulupa se encontró que el ácido orgánico de mayor importancia dada su concentración es el ácido cítrico, seguido por el ácido málico y en menores concentraciones se encontraron los ácidos ascórbico y oxálico (Tabla 3-1 y Figura 3-11).

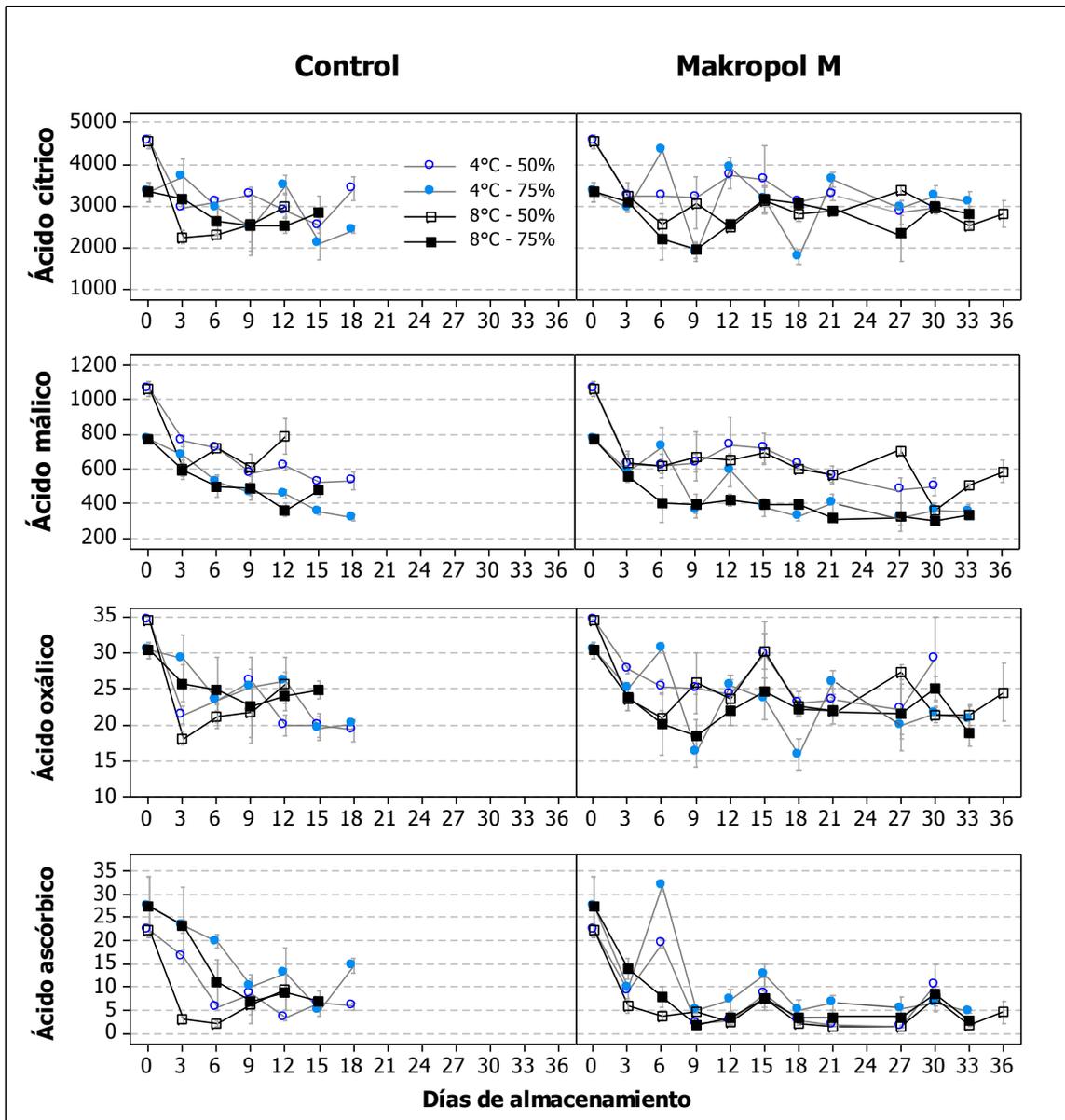
La presencia de éstos ácidos en la pulpa del fruto de gulupa también ha sido reportada por Castro-Cruz (2009), Castellanos-Espinosa (2010) y Flórez (2012).

Tabla 3-1: Promedios (\pm SD) de los parámetros bioquímicos de los frutos de gulupa en dos estados de madurez (50% y 75% cáscara púrpura) antes de aplicar los tratamientos (condiciones iniciales: cosecha) y al final del almacenamiento (último día del almacenamiento) a temperatura ambiental ($18\pm 2^\circ\text{C}$), en empaque Control y Makropol M. Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) según la prueba LSD de Fischer. LSD: Diferencia mínima significativa. PF: peso fresco de tejido.

TEJIDO	COSECHA			ALMACENAMIENTO				LSD
	Empaque Madurez	--		Control		Makropol M		
		50%	75%	50%	75%	50%	75%	
PULPA	Ascórbico ¹	22,4 \pm 2,3 a	27,4 \pm 11,3 a	6,9 \pm 2,4 b	25,6 \pm 4,0 a	5,4 \pm 1,6 b	4,6 \pm 0,5 b	9,1
	Cítrico ¹	4553,8 \pm 283 a	3322,9 \pm 405 b	1709,2 \pm 181 e	2729,2 \pm 324 c	2314,2 \pm 141 cd	2081,4 \pm 366 de	531,5
	Málico ¹	1059,1 \pm 76,7 a	769,1 \pm 50,1 b	479,5 \pm 48,2 c	425,8 \pm 29,6 c	325,2 \pm 45,9 d	205,2 \pm 61,6 e	96,1
	Oxálico ¹	34,5 \pm 0,1 a	30,3 \pm 1,9 a	18,7 \pm 2,7 b	23,7 \pm 2,2 b	21,9 \pm 1,9 b	18,6 \pm 5,9 b	5,3
	Sacarosa ²	55,8 \pm 8,6 a	58,3 \pm 4,8 a	18,3 \pm 1,8 bc	24,2 \pm 5,2 b	12,7 \pm 0,0 c	9,7 \pm 7,0 c	10,6
	Glucosa ²	27,5 \pm 9,8 b	39,5 \pm 2,6 a	18,5 \pm 5,7 b	20,3 \pm 7,0 b	28,1 \pm 4,8 b	23,3 \pm 4,0 b	10,9
	Fructosa ²	32,1 \pm 12,8 ab	43,1 \pm 3,3 a	19,6 \pm 5,9 b	21,6 \pm 7,3 b	29,4 \pm 4,8 b	24,2 \pm 3,8 b	12,6
	AZR ³	7,5 \pm 0,8 c	10,7 \pm 0,3 a	2,6 \pm 0,5 e	9,4 \pm 0,9 b	7,4 \pm 0,6 c	5,3 \pm 0,2 d	1,0
	FEN ⁴	9,6 \pm 0,8 b	12,2 \pm 0,8 ab	11,8 \pm 0,2 ab	8,8 \pm 4,7 b	10,2 \pm 0,2 b	14,8 \pm 0,3 a	3,5
	PROT ⁵	241,0 \pm 5,8 c	247,9 \pm 5,2 bc	243,8 \pm 4,2 c	212,4 \pm 52,3 c	290,7 \pm 6,0 ab	303,4 \pm 30,0 a	44,5
CÁSCARA	U POD ⁶	23,9 \pm 1,6 b	28,3 \pm 0,7 a	15,9 \pm 1,6 d	27,2 \pm 1,9 a	23,8 \pm 0,9 b	20,1 \pm 1,1 c	2,4
	U CAT ⁷	1,7 \pm 0,1 b	2,1 \pm 0,1 a	1,2 \pm 0,1 d	2,1 \pm 0,03 a	1,5 \pm 0,3 c	1,6 \pm 0,1 bc	0,2
	U PG ⁸	1,6 \pm 0,03 bc	1,4 \pm 0,05 d	1,8 \pm 0,06 a	1,5 \pm 0,05 cd	1,7 \pm 0,03 b	1,9 \pm 0,12 a	0,1
	AZR ³	63,7 \pm 3,8 b	75,0 \pm 1,4 a	42,8 \pm 3,3 d	71,9 \pm 6,1 a	61,7 \pm 2,7 b	52,7 \pm 0,4 c	6,1
	FEN ⁴	139,1 \pm 8,0 b	166,7 \pm 2,1 a	92,3 \pm 4,9 d	159,1 \pm 13,0 a	135,0 \pm 5,9 b	115,4 \pm 1,0 c	12,5
	PROT ⁵	408,4 \pm 18,4 a	365,7 \pm 5,2 b	327,0 \pm 10,0 a	368,1 \pm 11,6 b	372,9 \pm 4,9 b	377,2 \pm 7,2 b	18,8
	U POD ⁶	65,4 \pm 4,0 b	75,1 \pm 0,8 a	42,9 \pm 3,2 d	75,0 \pm 6,2 a	61,8 \pm 1,4 b	53,8 \pm 1,0 c	6,0
	U CAT ⁷	3,1 \pm 0,1 c	3,2 \pm 0,3 c	4,4 \pm 0,1 a	2,8 \pm 0,1 d	3,2 \pm 0,3 c	3,7 \pm 0,1 b	0,3
U PG ⁸	2,0 \pm 0,10 b	2,3 \pm 0,04 a	1,3 \pm 0,06 d	2,2 \pm 0,17 a	1,9 \pm 0,08 b	1,6 \pm 0,01 c	0,2	

¹ Ácidos orgánicos (mg/100g PF), ² azúcares (mg/g PF), ³ azúcares reductores (mg/100g PF), ⁴ polifenoles (mg/100g PF), ⁵ proteínas totales solubles (mg/100g PF), ⁶ actividad de peroxidasa (Δ Absorbancia a 436nm/min*g PF), ⁷ actividad de catalasa (μ mol de H₂O₂ descompuesto/min*g PF), ⁸ actividad de poligalacturonasa (μ g glucosa/min*g PF).

Figura 3-11: Evolución de la concentración promedio (mg de ácido/100g de PF) de ácidos orgánicos en la pulpa de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco. Barras indican error estándar ($n=3$).



Shiomi *et al.* (1996a), estudiaron el contenido de ácidos málico y cítrico durante la maduración poscosecha (25°C) de frutos de gulupa que se cosecharon en estado de madurez en el cual el color de la cáscara empieza a tornarse de verde a púrpura, y encontraron que el contenido de ácido cítrico fue alrededor de 8 veces mayor que el de ácido málico, además los autores destacan que la combinación del contenido de estos

dos ácidos en el día de la cosecha da un porcentaje menor (alrededor de 2%) respecto al de ATT. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el día inicial (Día cero) en la presente investigación (Tabla 3-1), en donde se encontró que el ácido cítrico es 5 veces mayor que el de ácido málico en frutos con 50% de madurez; pero se observó que la suma de los contenidos de ácido cítrico y málico, inclusive, oxálico y ascórbico, es mayor (5.4%) respecto al porcentaje de ATT (alrededor de 3.5%).

Durante el período de almacenamiento poscosecha de los frutos de gulupa se encontró que los contenidos de ácidos cítrico, málico, oxálico y ascórbico fueron muy similares entre los dos estados de madurez evaluados de los frutos de gulupa. Sin embargo, se observaron diferencias en el contenido de estos compuestos en el día inicial del experimento (Día cero), en el que se evidenció que la pulpa tiene mayor contenido de ácidos orgánicos en frutos en menor estado de madurez al momento de cosecha. Es así, que los ácidos cítrico, málico y oxálico se encontraron en mayores concentraciones en los frutos con 50% de madurez que en los frutos con 75% de madurez, y no se encontraron diferencias significativas en el contenido del ácido ascórbico (Vitamina C) entre los estados de madurez (Tabla 3-1).

El ácido ascórbico (ácido L-ascórbico) es la principal forma biológicamente activa de vitamina C, que se encuentra en estado reducido y actúa como un antioxidante efectivo dada su alta capacidad de donar electrones y la rápida reconversión hacia la forma activa reducida, razón por la cual es comúnmente empleado como aditivo de alimentos y como antioxidante (Valente *et al.* 2011). Debido al contenido de ácido ascórbico, Valente *et al.* (2011) han reportado que los frutos de gulupa son una fuente rica en vitamina C (considerando únicamente la contribución del ácido ascórbico), de manera que el consumo diario de 100 g de pulpa suplen entre el 36,3-40,3% del requerimiento nutricional diario de éste ácido en el ser humano, que es de 90 y 75 mg/día en hombres y mujeres mayores de 19 años respectivamente. En el presente estudio se encontró que los frutos con 50% y 75% de madurez en el día inicial del experimento (Día cero) tienen en promedio 24,9 mg de ácido ascórbico por 100 g de pulpa, de manera que el consumo diario de 100 g de su pulpa suplen el 27,7% y 33,2% del requerimiento nutricional para hombres y mujeres respectivamente. Pero se hace evidente que con el transcurso del almacenamiento de los frutos de gulupa, disminuye este potencial nutricional como fuente de ácido ascórbico en la alimentación (Figura 3-1).

En los frutos almacenados a temperatura ambiente, se observó una disminución generalizada en las concentraciones de ácidos cítrico, málico, ascórbico y oxálico con el transcurso del tiempo de almacenamiento para todos los estados de madurez y empaques, siendo significativamente menores al final del tiempo de almacenamiento de los frutos (Tabla 3-1). En general, en el día final del almacenamiento, los niveles de ácidos cítrico y oxálico fueron semejantes entre los empaques Control y Makropol M, pero en el primer empaque fueron superiores las concentraciones de los ácidos ascórbico y málico (Tabla 3-1).

De manera semejante, en los frutos refrigerados, se observó que también hubo una tendencia de disminución de las concentraciones de ácidos orgánicos con el transcurso del almacenamiento, para todos los empaques y estados de madurez (Figura 3-11). De manera que con respecto a las concentraciones iniciales, en el día final del almacenamiento se observó la reducción significativa de los ácidos ascórbico, oxálico y málico en todos los tratamientos, y la reducción significativa del ácido cítrico únicamente en los frutos con 50% de madurez (Figura 3-11). Con las excepciones de que los frutos con 50% de madurez almacenados a 8°C en Control y los frutos con 50% de madurez almacenados a 4°C en Makropol M presentaron en promedio una disminución de las concentraciones de ácido málico y ácido cítrico, respectivamente; sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa.

De manera que la disminución generalizada de los ácidos orgánicos que se encontró con el transcurso del tiempo, es semejante a lo que Castellanos-Espinosa (2010) ya ha reportado para frutos de gulupa provenientes de Boyacá y acondicionados y suministrados por la distribuidora Ocati S.A. Dicho investigador evaluó las concentraciones de los ácidos oxálico, cítrico, málico y ascórbico, durante el almacenamiento de frutos de gulupa de 50% y 75% de madurez, a temperaturas de 4°C, 8°C y ambiente (20°C) en empaque Xtend® (con base en polietileno de baja densidad que provee atmósfera modificada), y encontró que respecto al día inicial (Día cero), al final del almacenamiento en los frutos almacenados a temperatura ambiente disminuyeron los cuatro ácidos orgánicos, y en los frutos refrigerados a 4°C y 8°C disminuyeron los ácidos cítrico, málico y oxálico, aunque éste último únicamente disminuyó en los frutos con madurez del 75%.

Los ácidos orgánicos se acumulan durante la maduración del fruto y después son utilizados como sustratos respiratorios durante el *ripening* de los mismos (Moing *et al.* 2001). La reducción observada en el contenido de ácidos orgánicos con el transcurso del tiempo de almacenamiento, puede ser debida en parte al uso de éstos para la producción de energía, en adición a que pueden proveer esqueletos carbonados para la síntesis de fenoles incluyendo antocianinas y otros tipos de compuestos fenólicos, y para la síntesis “*de novo*” de azúcares después de la cosecha (Rapisarda *et al.* 2008). Por ejemplo, en cítricos, se ha reportado que los ácidos cítrico y ascórbico disminuyen durante el almacenamiento del fruto (Rapisarda *et al.* 2008). Además, a medida que el fruto alcanza su madurez fisiológica e inicia la maduración organoléptica, se ha encontrado que se incrementa la actividad catabólica de la enzima málica, la cual decarboxila el ácido L-málico a piruvato, que junto con la continua actividad de las enzimas malato dehidrogenasa y citrato sintasa resulta en la disminución de los niveles del ácido L-málico (Oms-Oliu *et al.* 2011).

Se encontró que en general, al final del almacenamiento fue significativamente mayor la concentración de ácidos cítrico, málico y oxálico en los frutos refrigerados que en los almacenados a temperatura ambiente, para todos los tratamientos con excepción de los frutos con 75% de madurez empacados en Control (Tabla 3-1 y Figura 3-11). Lo cual es semejante a lo encontrado por Castellanos-Espinosa (2010) en pulpa de gulupa, quien reportó que para los estados de madurez de 50% y 75% fueron mayores las disminuciones de ácidos orgánicos a temperatura ambiente que a 4 y 8°C. Siendo consistente con reportes de que el almacenamiento en frío provee mejor conservación de los ácidos orgánicos (Barboni *et al.* 2010), lo cual es debido a que con altas temperaturas se presentan mayores tasas respiratorias y por consiguiente se consumen más sustratos respiratorios como ácidos orgánicos y azúcares (Getinet *et al.* 2011), mientras que con las bajas temperaturas el metabolismo se encuentra desacelerado por la disminución de la velocidad de las reacciones enzimáticas, de manera que es más lento el consumo y degradación de ácidos orgánicos y por consiguiente es mayor su contenido que con temperatura ambiente (18°C).

Al final del almacenamiento de los frutos de gulupa, en general hubo efectos de interacción entre los factores evaluados sobre los niveles de ácidos orgánicos en la pulpa. De manera que para los ácidos cítrico y málico hubo interacción significativa entre

la temperatura y la madurez ($F=4,91$; $p=0,017$ y $F=4,40$; $p=0,024$, respectivamente) y en ácido málico adicionalmente hubo interacción significativa entre temperatura y empaque ($F=4,67$; $p=0,020$). Encontrándose al final del almacenamiento, para los frutos refrigerados (4°C y 8°C), que en estado de madurez de 50% hubo significativamente mayor contenido de ácido málico que con madurez del 75%, lo cual se observó también para el ácido cítrico, pero solamente en los frutos a 4°C . Como consecuencia de esto, se destacó que las mayores concentraciones de ambos ácidos se presentaron en los frutos con madurez del 50% en condiciones de refrigeración, donde a 8°C se obtuvo el mayor contenido de ácido málico siendo de 788,5 y 581,7 mg/100g de pulpa en el empaque Control y Makropol M, respectivamente, en tanto que a 4°C se encontró el mayor contenido de ácido cítrico, de 3420,9 mg/100g de pulpa en el empaque Control y, de 3945,4 mg/100g de pulpa en Makropol M, siendo este último semejante a los niveles en el día cero (Figura 3-11).

En general, la concentración de ácido málico al final del almacenamiento, fue significativamente mayor en los frutos empacados en Control, respecto a Makropol M, exceptuando los almacenados a 4°C en los que los niveles fueron semejantes entre los dos empaques (Figura 3-11).

No hubo efecto significativo de los tratamientos sobre el contenido de ácido oxálico en la pulpa de los frutos de gulupa al finalizar el período de almacenamiento, a pesar de que el modelo indicó efecto de interacción de empaque y madurez ($F=6,65$; $p=0,017$; $R\text{-Sq}=44,02\%$; $R\text{-Sq}(\text{adj})=17,24\%$) pero no se consideró significativo dado a la baja proporción de la variabilidad de los datos que explicó el modelo. Sin embargo, se observó que en promedio, los frutos tienden en el empaque Makropol M a mantener mayor contenido de ácido oxálico con el estado de 50% respecto a 75% de madurez, y en el empaque control a presentar mayores promedios a 8°C respecto a 4°C y temperatura ambiente. Lo cual es similar al comportamiento de los ácidos cítrico y málico, pero a diferencia de estos, en el empaque Makropol M la concentración de ácido oxálico es mayor a 4°C que a 8°C , siendo ambas mayores que la concentración a temperatura ambiente (Figura 3-11 y Tabla 3-1).

El contenido de ácido ascórbico al final del almacenamiento, presentó interacción significativa entre los factores empaque, temperatura y madurez ($F=6,47$; $p=0,006$).

Encontrándose que al finalizar el almacenamiento, el mayor contenido de este ácido ocurrió en frutos de 75% de madurez almacenados en empaque Control a temperatura ambiente (Tabla 3-1), y para los demás tratamientos los niveles fueron menores y semejantes entre sí (Figura 3-11). Particularmente, el mayor nivel de ácido ascórbico observado en los frutos de 75% de madurez almacenados en empaque Control a temperatura ambiente, puede estar asociado a que en ese tratamiento el período de almacenamiento fue el más corto, siendo apenas de 3 días, y considerando que este ácido se reduce conforme incrementa el tiempo del almacenamiento poscosecha, entonces es factible que el contenido de ácido ascórbico no haya variado significativamente en este tratamiento con respecto a los niveles en el día cero, dado al corto período de tiempo.

Ha sido reportado en otros frutos que durante la poscosecha disminuye el contenido de ácido ascórbico (Oms-Oliu *et al.* 2011), y que el prolongamiento del tiempo de almacenamiento acelera las pérdidas, al igual que también lo causa el incremento de la temperatura puesto que las altas temperaturas aceleran la oxidación del ácido ascórbico (Lee & Kader 2000). Sin embargo, en el presente estudio no se encontró dicho efecto de la temperatura en los frutos de gulupa, en los que el contenido de éste ácido fue en general similar en los frutos refrigerados que a temperatura ambiente, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que a bajas temperaturas se ha reportado que se reduce el contenido de ácido ascórbico por daño por frío (Lee & Kader 2000). Pero también, puede ser consecuencia del prolongamiento del almacenamiento en los frutos refrigerados con respecto a los almacenados a temperatura ambiental.

3.2.2 Azúcares

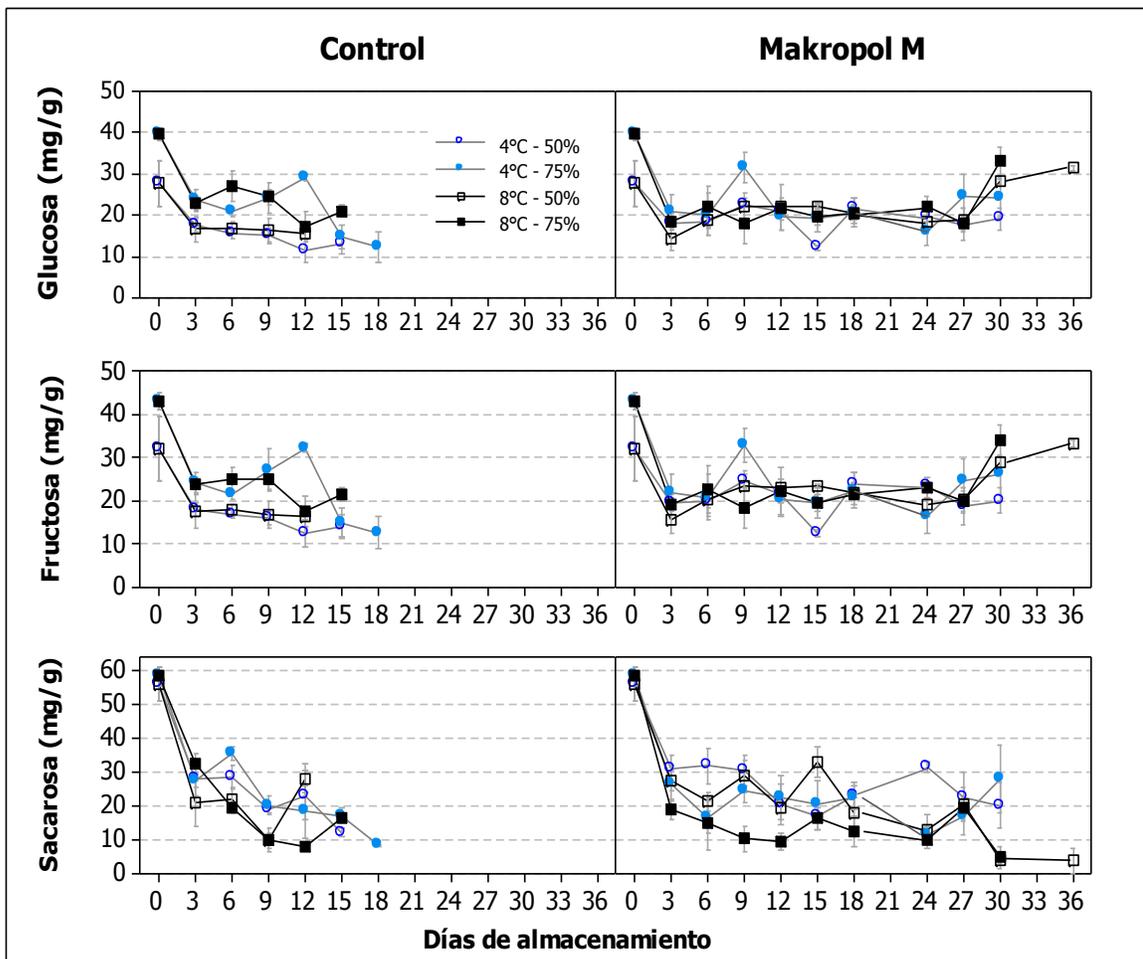
Sacarosa, glucosa y fructosa

En general, el contenido de sacarosa de la pulpa disminuyó con el transcurso del almacenamiento, encontrándose una reducción significativa de su contenido en el día final respecto al día inicial en todos los tratamientos (Figura 3-12 y Tabla 3-1). En el día final del almacenamiento, se encontró que la sacarosa fue afectada por la interacción entre el empaque y la temperatura ($F=18,66$; $p=0.000$), de manera que se observó que en general fueron mayores los contenidos de sacarosa en los frutos almacenados a 4°C

respecto a las otras dos temperaturas en Makropol M, en tanto que en el empaque Control fueron menores.

De manera semejante que en la sacarosa, durante el transcurso del almacenamiento también se observó la disminución de los contenidos de glucosa y fructosa en la pulpa de los frutos de gulupa (Figura 3-12 y Tabla 3-1). Sin embargo, en el empaque Makropol M se observó que hacia el final del almacenamiento, los frutos refrigerados a 4°C y 8°C presentaron un incremento de estos dos azúcares, que ocasionó que sus valores finales fueran cercanos a las concentraciones iniciales (Día cero).

Figura 3-12: Evolución de la concentración promedio (mg de azúcar/g de PF) de ácidos orgánicos en la pulpa de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco. Barras indican error estándar ($n=3$).



En el día final del almacenamiento, las concentraciones de glucosa y fructosa en la pulpa de los frutos de gulupa, fueron afectadas significativamente por la temperatura (glucosa: $F=6,85$; $p=0,005$ y fructosa: $F=6,11$; $p=0,007$) y el empaque (glucosa: $F=29,31$; $p=0,000$ y fructosa: $F=29,98$; $p=0,000$ respectivamente). De manera que para ambos azúcares se encontraron concentraciones significativamente menores a 4°C que a 8°C y 18°C, y significativamente mayores en el empaque Makropol M que en el Control (Figura 3-12 y Tabla 3-1).

En frutos de gulupa almacenados a temperatura ambiente de 25°C, Shiomi *et al.* (1996a) reportaron que el contenido de sacarosa disminuyó con el tiempo de almacenamiento en tanto que los contenidos de glucosa y fructosa se incrementaron, pero que durante este proceso de maduración poscosecha el contenido de azúcares totales se mantuvo casi constante. Similares resultados se presentaron en los frutos de gulupa almacenados a temperatura ambiente en cuanto a sacarosa; pero contrastante con los resultados de glucosa y fructosa del presente estudio, en el que se observó que estos azúcares disminuyeron durante el almacenamiento (Figura 3-12), lo cual puede deberse a que los azúcares están siendo empleados como sustrato respiratorio (Dantas de Morais *et al.* 2008), de manera que la sacarosa se hidroliza en glucosa y fructosa disminuyendo su contenido con el transcurso del tiempo, y a su vez los contenidos de estos dos monosacáridos se ven atenuados porque a su vez se emplean como sustratos respiratorios y no alcanzan a acumularse porque se consumen más rápidamente de lo que son producidos.

Los menores contenidos de sacarosa en los frutos almacenados a temperatura ambiente en empaque Makropol M, pueden estar asociados al aumento de las tasas de hidrólisis de azúcares complejos como la sacarosa con el incremento de la temperatura (Getinet *et al.* 2011) y a que a altas temperaturas también se alcanzan mayores tasas de respiración, lo que conlleva a una conversión más rápida de sustratos respiratorios como azúcares (sacarosa) (Getinet *et al.* 2011).

Adicionalmente, de manera semejante al presente estudio, Kishore *et al.* (2011) reportaron también en frutos de gulupa que ocurre una disminución de los azúcares reductores (glucosa y fructosa) y no reductores (sacarosa) durante el almacenamiento poscosecha de los frutos, de manera que tanto a temperatura ambiental, como a bajas

temperaturas de 6, 8, y 11°C se presentó disminución de estos azúcares con el transcurso del almacenamiento.

Sin embargo, se ha sugerido que el metabolismo de los carbohidratos influencia la sensibilidad de los tejidos de la planta al frío, de manera que durante la poscosecha de los frutos se ha encontrado que el metabolismo del almidón-a-sacarosa participa en el mecanismo de tolerancia al frío (Der Agopian *et al.* 2011). Por ejemplo en frutos de banana, se ha reportado que las bajas temperaturas ocasionan cambios sobre este metabolismo, encontrándose que la acumulación de sacarosa y el incremento de las actividades de enzimas como amilasas, fosforilasas del almidón y sacarosa fosfato sintasa confieren resistencia al frío y por tanto una menor susceptibilidad del fruto al daño por frío (Der Agopian *et al.* 2011). Este mecanismo también se ha reportado como respuesta fisiológica al daño por frío en frutos de mamey - *Pouteria sapota* (Pérez-Tello *et al.* 2009), en donde se encontró que el contenido de sacarosa se incrementó con la disminución en la temperatura de almacenamiento, siendo mayor el contenido a 2°C que a 10°C. Adicionalmente, además en el fruto de *Eriobotrya japonica* encontraron que los frutos más tolerantes al daño por frío presentaron menores niveles de sacarosa, pero mayores niveles de glucosa y fructosa (azúcares reductores), de manera que el incremento de estas hexosas se asoció con el incremento de la tolerancia al frío (Cao *et al.* 2013).

En el presente estudio se encontró al finalizar el almacenamiento de los frutos, que en el empaque Control las concentraciones de sacarosa alcanzadas a 4°C fueron menores que a 8°C, lo cual no es de esperarse dado que a menor temperatura debería estar reducido el metabolismo y por tanto el desdoblamiento de azúcares, de manera que la sacarosa debería estar en mayor concentración. Este comportamiento a 4°C, podría entonces estar indicando un metabolismo alterado que podría asociarse al daño por frío. Adicionalmente, los menores contenidos de fructosa y glucosa en estos mismos frutos, reflejarían que no hay un mecanismo de acumulación de azúcares que pudieran incrementar la tolerancia al daño por frío, siendo entonces los frutos de gulupa más susceptibles al daño por frío.

Por otra parte, en el empaque Makropol M las concentraciones de sacarosa alcanzadas al final del almacenamiento, fueron superiores a 4°C que a 8°C, posiblemente por el

menor metabolismo con la disminución de la temperatura. Entonces se hace evidente que el uso de empaque Makropol M puede probablemente minimizar el daño por frío de los frutos de gulupa con el almacenamiento a 4°C, pudiendo estar implicados los mayores contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa en la disminución de la susceptibilidad de estos frutos a 4°C.

Los mayores contenidos de glucosa y fructosa en el empaque Makropol M con respecto al empaque Control, pueden ser consecuencia de que el empaque Makropol M al proveer una atmósfera modificada reduce la tasa de respiración de los frutos de gulupa, y por tanto disminuye el consumo de los glucosa y fructosa como sustratos respiratorios, de manera que con el uso de ese empaque se preservan más altas las concentraciones de ambos azúcares.

La razón fructosa/glucosa se mantuvo constante en el tiempo y fue de 1.14 para todos los tratamientos de temperatura, empaque y estado de madurez (Figura 2.15), e incluso se encontró una alta correlación ($r=0,988$; $p=0,000$) entre estos dos azúcares, que visualmente se aprecia en el comportamiento y concentraciones casi idénticas de estos dos azúcares (Figura 3-12 y Tabla 3-1). Esta proporción prácticamente de 1:1, ha sido generalmente atribuida a la actividad de la invertasa que es responsable del rompimiento de la sacarosa en glucosa y fructosa (Oms-Oliu *et al.* 2011), además en otros frutos como el tomate, también se ha encontrado que estos dos azúcares están en igual cantidad durante la maduración organoléptica (Oms-Oliu *et al.* 2011).

En general, no se encontró efecto significativo del estado de madurez de los frutos de gulupa sobre los contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa en la pulpa del fruto. Únicamente en el día cero, se encontró que el contenido de sacarosa se incrementó con el estado de madurez del fruto, y que los contenidos de glucosa y fructosa en los frutos con 50% de madurez fueron menores que en aquellos con 75% de madurez (Figura 3-12 y Tabla 3-1). Además en este día (Día cero) se encontró que el contenido de sacarosa doblaba los contenidos de glucosa y fructosa, para los dos estados de madurez estudiados. Un resultado similar fue reportado por Shiomi *et al.* (1996a), quienes estudiaron el contenido de azúcares durante la maduración poscosecha de frutos de gulupa que se cosecharon en estado de madurez en el cual el color de la cáscara empieza a tornarse de verde a púrpura, y reportaron que el contenido de sacarosa fue

Respecto al día inicial, hubo en promedio una disminución de los azúcares reductores en el día final del almacenamiento de los frutos de gulupa, en pulpa y cáscara, pero en ésta última, en los frutos con 50% de madurez con empaque Makropol M no hubo variación con respecto al día inicial. Para ambos tejidos, se observó que la disminución inicial del contenido de azúcares reductores alcanzó niveles más bajos con el empaque Control que con Makropol M, mostrando entonces que durante el transcurso del almacenamiento este parámetro evolucionó en el tiempo de manera semejante en ambos empaques, pero los cambios durante esta evolución son menos acentuados en Makropol M.

En el día final del almacenamiento, se observó un efecto de interacción entre empaque, madurez y temperatura tanto en pulpa ($F=5,83$; $p=0,009$) como en cáscara ($F=30,25$; $p=0,000$). En pulpa y cáscara se encontró, que en general el contenido de azúcares reductores no difirió significativamente entre los frutos refrigerados a 4 y 8°C, los cuales, en el empaque Makropol M fueron semejantes a los contenidos alcanzados al final del almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que en el empaque Control fueron menores que los de temperatura ambiental con 75% de madurez. En general, al final del almacenamiento en el empaque Makropol M se alcanzaron en promedio mayores contenidos de azúcares reductores en cáscara y pulpa que con el empaque Control, exceptuando los frutos de 75% de madurez a 18°C.

Los niveles alcanzados al final del almacenamiento, respecto a los iniciales en el día cero, fueron significativamente menores, con excepción de los niveles en cáscara de los frutos en empaque Makropol M con 50% de madurez.

La disminución de los azúcares reductores con el transcurso del almacenamiento, en la pulpa de los frutos de gulupa, observada en todas las temperaturas, se asocia con la disminución que se encontró de los contenidos de fructosa y glucosa (Figuras 3-12 y 3-13). Además, Kishore *et al.* (2011) ya han reportado la disminución durante la poscosecha de los azúcares reductores en la pulpa de frutos de gulupa, a 4 temperaturas de almacenamiento indicando que estos compuestos disminuyen conforme transcurre el tiempo del almacenamiento alcanzándose menores niveles a en los frutos a temperatura ambiente (25°C) y a 11°C respecto a los refrigerados a 6 y 8°C. Sin embargo, de manera contraria, en el presente estudio los menores niveles se encontraron en los frutos refrigerados.

Kishore *et al.* (2011) indican además, que la disminución de los azúcares reductores durante el almacenamiento de la gulupa puede atribuirse a la actividad respiratoria en la que se emplean la glucosa y fructosa en el proceso respiratorio.

3.2.3 Fenoles

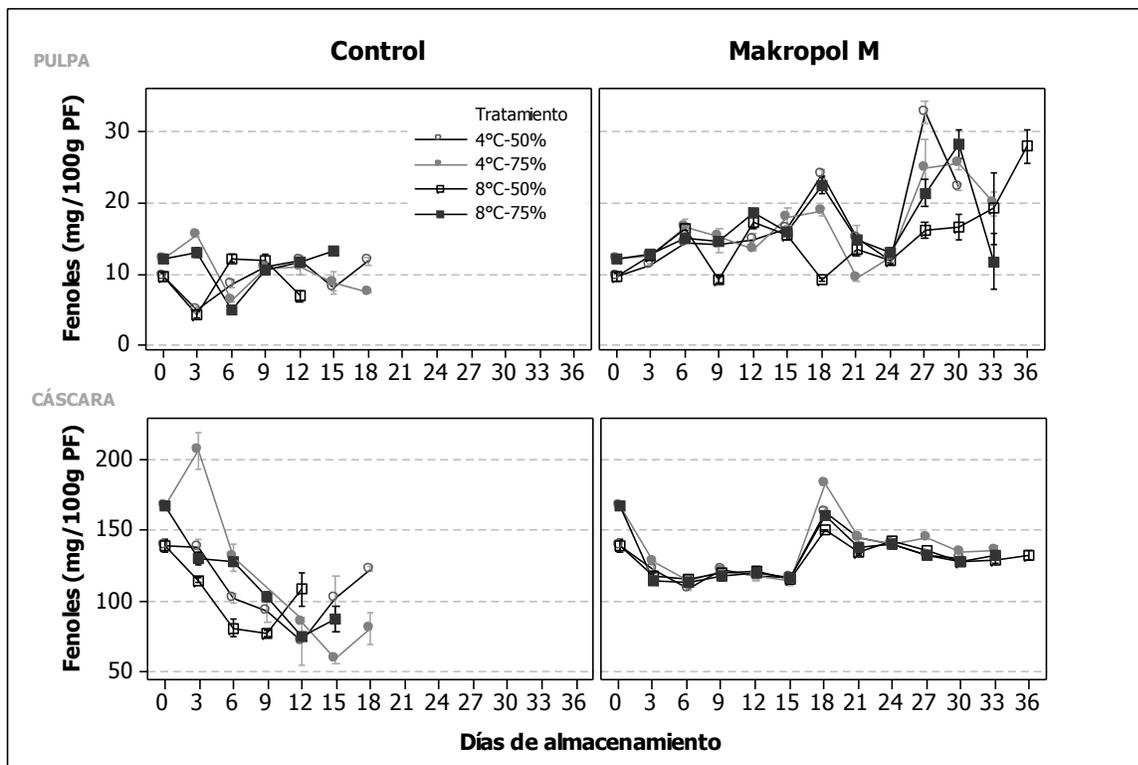
El contenido de fenoles de los frutos de gulupa fue menor en la pulpa que en la cáscara en el caso de los dos empaques (Figura 3-14 y Tabla 3-1), lo cual también se ha reportado para manzanas (Adyanthaya 2007), en las que el contenido de fenoles en cáscara es mucho mayor que en pulpa. La acumulación de fenoles solubles es mayor en tejidos externos como la epidermis y subepidermis que en tejidos internos como el mesocarpo y la pulpa, por ejemplo en muchos frutos se encuentra que los glicósidos flavonólicos se localizan en la parte externa o en el epicarpo del fruto, incluso se ha encontrado en frutos comestibles de *Passiflora* que los glucósidos y rutinósidos se concentran mayormente en la cáscara que en la pulpa (Chassagne *et al.* 1997).

Durante las primeras tres semanas, el contenido promedio de fenoles en pulpa en general permaneció constante en todos los frutos de gulupa empacados en Control y en los almacenados a temperatura ambiente en Makropol M, mientras que en los refrigerados en éste último empaque se observó un incremento durante el almacenamiento, alcanzando al final de éste niveles significativamente mayores a las condiciones iniciales (Figura 3-14 y Tabla 3-1). El comportamiento constante del contenido de fenoles en la pulpa de los frutos de gulupa durante el almacenamiento, ya ha sido reportado en pulpa de otros frutos como mango (Lounds-Singleton 2003) y fresas (Cordenunsi *et al.* 2005), además en éstas últimas también se observó que el contenido no varió entre las temperaturas de 6°C, 16°C y 25°C, lo cual es concordante con el comportamiento observado en el empaque control que no varió con la temperatura de almacenamiento de los frutos de gulupa.

Estos resultados indican que en la pulpa de gulupa el metabolismo de los fenoles fue relativamente estable durante el almacenamiento puesto que al final de la vida útil en general se mantuvieron los mismos niveles iniciales, sin importar la temperatura en empaque Control. Considerando, que según reportes de literatura los fenoles presentan beneficios para la salud humana porque pueden actuar como antioxidantes efectivos

estabilizando los radicales libres gracias a su capacidad de donar electrones o iones de hidrógeno de los grupos hidroxilo posicionados en torno al anillo aromático (Bravo 1998, Knekt *et al.* 2002, Adyanthaya 2007, Tsao 2010), se puede destacar que en este aspecto nutricional, los beneficios de los fenoles contenidos en la pulpa del fruto de gulupa pueden mantenerse hasta el final de la vida útil de los frutos en empaque control y también en aquellos a temperatura ambiente en Makropol M. Sin embargo, si bien es constante el contenido de fenoles encontrado en la pulpa de la gulupa, es posible que la composición de fenoles varíe con el transcurso del almacenamiento, por lo cual es necesario hacer estudios posteriores para confirmar cómo es la evolución en el tiempo de los contenidos de fenoles con potencial nutracéutico, bajo estos tratamientos, para establecer si su contenido se mantiene en cantidades apreciables para conferir beneficio a la salud humana luego de las condiciones de almacenamiento de los frutos de gulupa.

Figura 3-14: Evolución de la concentración promedio de fenoles (mg/100g de PF) en pulpa y cáscara de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco del tejido. Barras indican error estándar ($n=3$).



En el día final del período de almacenamiento, se observó un efecto de interacción entre empaque, madurez y temperatura tanto en pulpa ($F=24,42$ y $p=0,000$) como en cáscara ($F=32,58$; $p=0,000$). En pulpa se encontró que en el día final del almacenamiento el contenido de fenoles fue significativamente mayor en los frutos refrigerados en empaque Makropol M, en tanto que en los demás tratamientos fue semejante entre sí, permaneciendo prácticamente invariable al final del almacenamiento respecto a las condiciones iniciales. El comportamiento en el día final del almacenamiento en cáscara es semejante que el de los azúcares reductores en cáscara (ver detalles en la descripción de azúcares reductores en cáscara) que fue semejante a la descrita para cáscara de azúcares reductores.

La evolución en el tiempo del contenido de fenoles en cáscara, presentó el mismo comportamiento descrito para azúcares reductores, de manera que en general el contenido de fenoles no difirió significativamente entre los frutos refrigerados a 4 y 8°C, los cuales, en el empaque Makropol M fueron semejantes a los contenidos alcanzados al final del almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que en el empaque Control fueron menores que los de temperatura ambiental con 75% de madurez. En general, en el empaque Makropol M se alcanzaron en promedio mayores contenidos de fenoles en cáscara al final del período de almacenamiento que con el empaque Control, exceptuando los frutos a de 75% de madurez a 18°C (Figura 3-14 y Tabla 3-1).

En el empaque Control, el contenido de fenoles en la cáscara se redujo con el transcurso del tiempo de los frutos almacenados a temperatura ambiente (Figura 3-14), lo que es consistente con la disminución del contenido de polifenoles que ocurre típicamente con el *ripening* de los frutos (Lounds-Singleton 2003). Este mismo comportamiento se observó para los frutos refrigerados en dicho empaque, pero adicionalmente en éstos se observó un incremento del contenido de fenoles al final del período de almacenamiento (Figura 3-14), lo cual ya ha sido reportado en cerezas, frambuesas, grosellas rojas y cerezas ácidas (Piljac-Žegarac & Šamec 2011), en los que se ha encontrado que durante el almacenamiento a 4°C existe una reducción del contenido de fenoles y que hacia el final del período de almacenamiento se presenta un incremento. En dicho estudio, además, se encontró que las cerezas y grosellas rojas al final del almacenamiento presentaron un contenido total de fenoles significativamente más alto a 4°C que a 25 °C, lo cual también se observó en la cáscara en los frutos de gulupa cuando se almacenaron a 4°C en

empaque Control con 50% de madurez y en la pulpa de los empacados en Makropol M a 4°C.

Se observó que el efecto sobre la cáscara de gulupa del empaque Makropol M respecto a los frutos en empaque Control, fue en general de reducir la magnitud de la disminución del contenido de fenoles, lo cual también ocurrió con el contenido de azúcares reductores tanto en cáscara como en pulpa (Figuras 3-14 y 3-13, Tabla 3-1).

Durante el almacenamiento de los frutos, se evidenció en todos el cambio de coloración, el cual a pesar de que podría estar asociado a un incremento de antocianinas, no mostró un aumento en el contenido de fenoles en cáscara, sino por el contrario se evidenció la disminución de estos fenoles a temperatura ambiente y en refrigeración, lo cual puede soportar la idea de que los cambios en la composición de los fenoles pueden ocurrir, a pesar de que las tendencias del contenido de fenoles totales sean distintas. Un ejemplo de esto ya se ha reportado en frutos de fresa (Cordenunsi *et al.* 2005) en los que a pesar de que el contenido de antocianinas se incrementó durante la maduración poscosecha, no se observó correlación con el contenido de fenoles totales determinado mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Una explicación alternativa, al incremento de fenoles en cáscara en el día 18 en los frutos a 4°C en Control y en los frutos refrigerados en Makropol M, es la posibilidad de que dicho incremento sea consecuencia de daño por frío ocasionado por las bajas temperaturas y el prolongamiento del tiempo de almacenamiento, ya que se ha reportado que el contenido de polifenoles puede incrementarse en condiciones de estrés abiótico y se ha encontrado que se incrementa después del daño por frío (Lounds-Singleton 2003).

3.2.4 Proteínas

En los frutos de gulupa en el día inicial del experimento (Día cero), antes de la aplicación de los tratamientos de almacenamiento, se observó que la cáscara de los frutos con 50% de madurez tenía mayor contenido de proteínas que la de los frutos con 75% (Tabla 3-1). Estos resultados indican que en la cáscara de los frutos con 50% de madurez se encontraba el más alto contenido de proteínas porque estaban en camino a desarrollar los cambios propios de la maduración (*ripening*), mientras que los frutos con 75% de

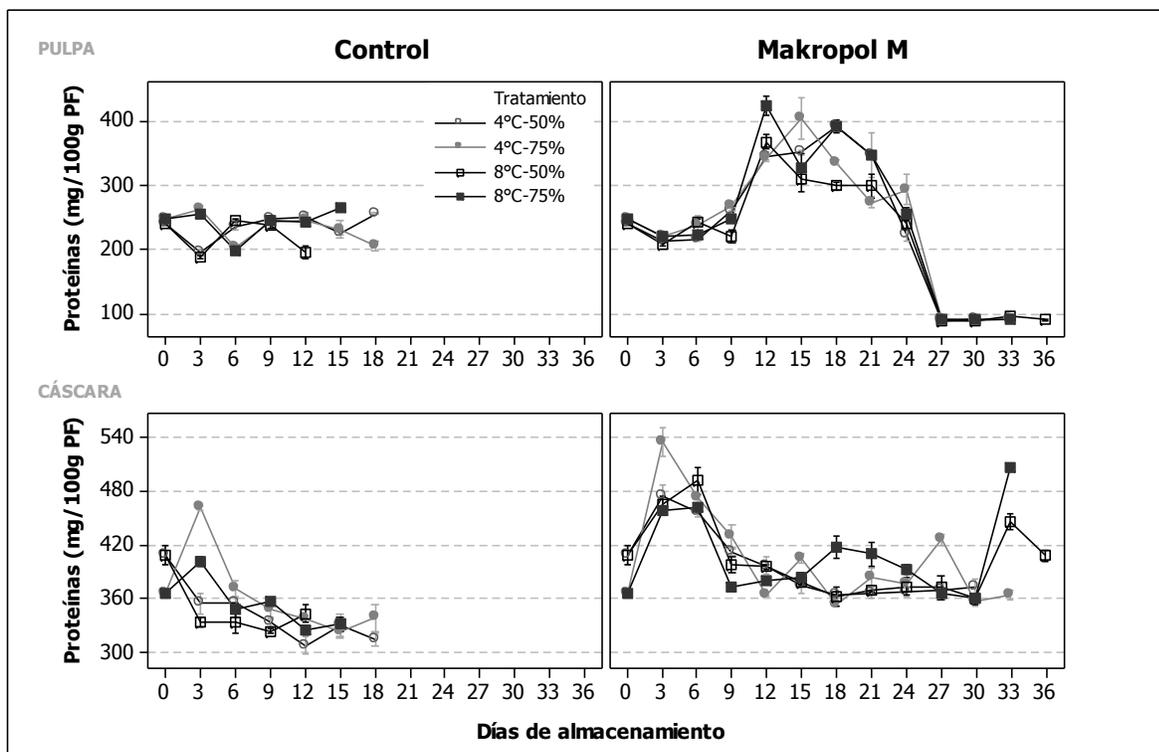
madurez tenían menor nivel de proteínas dado que ya estaba más adelantado el progreso de estos cambios.

Para todos los tratamientos evaluados, se encontró que el contenido de proteínas (al igual que el de azúcares reductores y fenoles) fue mayor en la cáscara que en la pulpa del fruto de gulupa (Figura 3.14); este mismo comportamiento fue reportado por Bashir & Abu-Goukh (2003) en frutos de dos variedades de guayaba en los contenidos de proteínas, azúcares reductores y fenoles.

La evolución del contenido de proteínas en la pulpa de los frutos de gulupa, fue distinta para los diferentes empaques (Figura 3-15 y Tabla 3-1). En el empaque Control, los frutos almacenados a temperatura ambiente mantuvieron semejantes niveles de proteínas hasta final del almacenamiento respecto de los niveles iniciales, y de igual manera los refrigerados mostraron un comportamiento oscilante en el tiempo entorno a los niveles del día inicial (Figura 3-15 y Tabla 3-1). En tanto que en el empaque Makropol M, en los frutos a temperatura ambiental los niveles de proteínas aumentaron con el transcurso del tiempo, de manera que al final del almacenamiento alcanzaron niveles superiores de proteínas respecto a los niveles del día inicial; y en los frutos refrigerados se presentó una primera etapa de incremento gradual del contenido de las proteínas hasta el día 18 (semejante a la evolución a temperatura ambiente), luego de la cual disminuyó con mayor velocidad hasta alcanzar el mínimo en el día 27 de almacenamiento, en el cual se estabilizó hasta el día final del almacenamiento.

En la cáscara, la evolución en el tiempo del contenido de proteínas, fue también distinta según el empaque (Figura 3-15 y Tabla 3-1). En los frutos almacenados en empaque Control, excepto para los frutos de 75% de madurez a temperatura ambiente, se observó una reducción significativa de las proteínas con el transcurso del tiempo, de manera tal que al final del período de almacenamiento los almacenados a 4°C y 8°C presentaron menores contenidos de proteínas que los almacenados a temperatura ambiente. En tanto, que los frutos en empaque Makropol M presentaron un incremento en la primera semana de almacenamiento, luego de lo cual se redujo alcanzando un mínimo entre los 15 y 18 días de almacenamiento y en los frutos refrigerados continuó en este nivel hasta el día final del almacenamiento, en el que se presentó un incremento únicamente en los frutos a 8°C superando los niveles iniciales (Día cero).

Figura 3-15: Evolución de la concentración promedio de proteínas solubles (mg/100g de PF) en pulpa y cáscara de frutos de gulupa de dos estados de madurez (50% y 75% de cáscara púrpura) almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaques Control y Makropol M. PF: peso fresco del tejido. Barras indican error estándar (n=3).



En el día final del período de almacenamiento, el contenido de proteínas solubles en pulpa y cáscara se vio significativamente afectado por las interacción entre temperatura, empaque y estado de madurez ($F=9,51$; $p=0,001$ y $F=29,81$; $p=0,000$ respectivamente). De manera que en el final del almacenamiento de los frutos de gulupa, en la pulpa, se encontró el menor contenido de proteínas en los almacenados a 4°C y 8°C en Makropol M, y el mayor a temperatura ambiente en este mismo empaque. En general se destaca que en este día el contenido de proteínas en cáscara fue mayor en los frutos almacenados en empaque Makropol M que en Control, y que los frutos a 8°C en Makropol tuvieron el mayor contenido protéico siendo superior a mayor estado de madurez.

En el empaque Control, la tendencia del contenido de proteínas totales en la pulpa a todas las temperaturas, de permanecer prácticamente invariable en el tiempo, ya ha sido encontrada en otros frutos como el melón reticulado (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*

Naud) (Lamikanra & Watson 2001), en el que no se encontraron cambios significativos en el nivel de proteínas durante el período de almacenamiento poscosecha. En tanto que con este mismo empaque, la disminución del contenido de proteínas observada en general para la cáscara del fruto de gulupa, puede relacionarse con el proceso de senescencia, ya que se ha reportado que durante la senescencia de los frutos disminuye el contenido de proteínas debido a su degradación (Alia-Tejacal *et al.* 2002, Bashir & Abu-Goukh 2003), y también puede ser resultado de la disminución de la capacidad de la síntesis proteica como del inicio de una débil proteólisis mediada por las proteasas como lo ha postulado Kouakou-Dje *et al.* (2010) durante el almacenamiento de tubérculos.

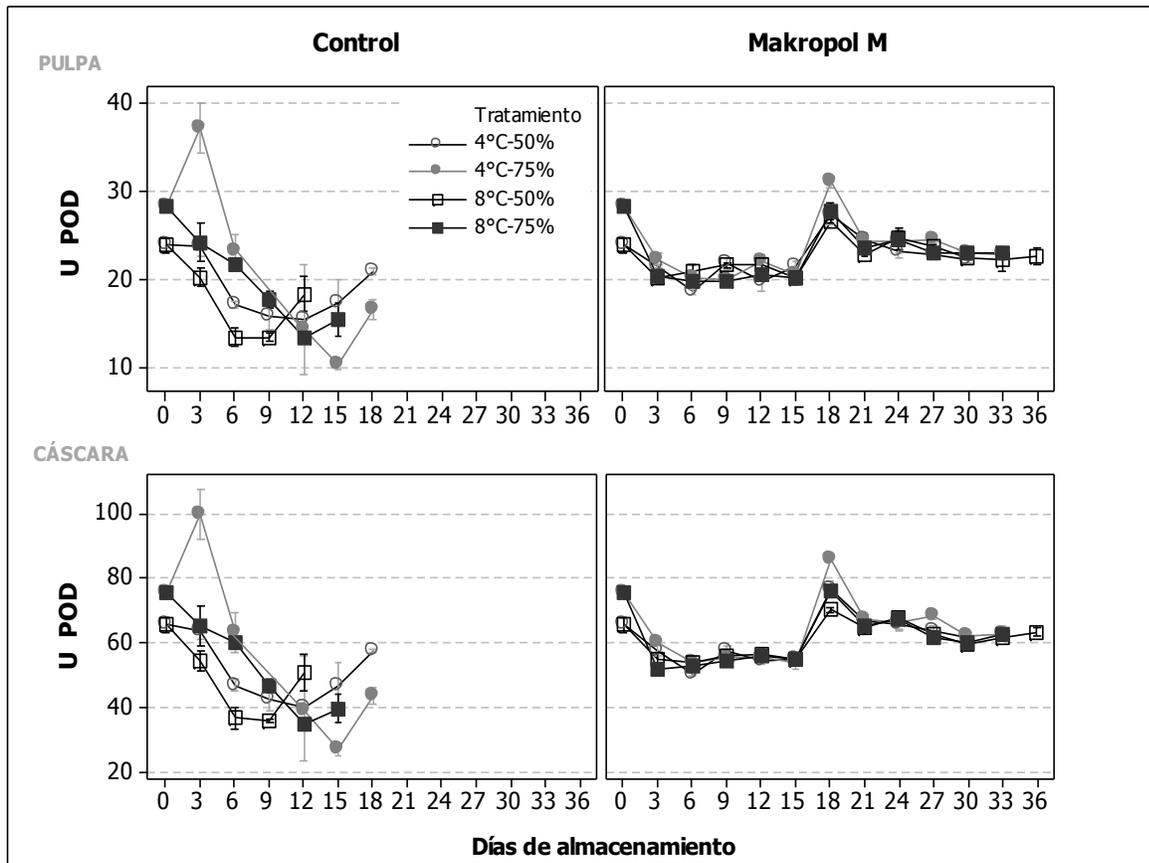
En el empaque Makropol M, el incremento en pulpa de las proteínas observado durante los primeros 18 días de almacenamiento, puede estar relacionado con el aumento de la actividad en pulpa de las enzimas peroxidasa y poligalacturonasa entre los días 6 al 18, en tanto que la disminución de proteínas posterior al día 18, puede relacionarse con la disminución de la tasa de incremento de las actividades de ambas enzimas después de éste día, las cuales hacia el día 27 alcanzan niveles que se mantienen relativamente constantes hasta el final del período de almacenamiento. Además, un comportamiento similar, ya se ha encontrado en pulpa de frutos de guayaba blanca y guayaba rosada (Abu-Goukh & Bashir 2003), reportándose un incremento del contenido de proteínas totales durante las primeras dos semanas de almacenamiento seguido de una rápida reducción, de manera que los autores indican que este incremento se correlacionó con el aumento progresivo de la actividad de la poligalacturonasa y que la reducción en el contenido de proteínas puede explicarse por la degradación de proteínas durante la senescencia, lo que soporta la idea de que las proteínas en los frutos en *ripening* son fundamentalmente enzimas requeridas para llevar a cabo este proceso. Es posible entonces que la disminución observada del contenido de proteínas en los frutos refrigerados en Makropol M, sea consecuencia de la hidrólisis de proteínas por el proceso de maduración hacia la senescencia.

Además, en general se observó que los frutos almacenados en empaque Control presentan en promedio un menor contenido proteico en cáscara que los almacenados en empaque Makropol M, lo cual podría soportar la idea que la prolongación del tiempo de almacenamiento ofrecida por el empaque Makropol M, se asocia a la disminución del metabolismo, y en este caso a la reducción de la degradación de las proteínas.

3.2.5 Peroxidasa

La evolución de la actividad peroxidasa (POD) en los frutos de gulupa, tuvo un comportamiento similar en pulpa y en cáscara, presentando mayores actividades en la cáscara que en la pulpa (Figura 3-16 y Tabla 3-1), lo cual es similar al comportamiento que presentaron los azúcares reductores. Se observó en los frutos refrigerados, que la actividad de POD disminuyó con el transcurso del almacenamiento en el empaque Control, mientras que en el empaque Makropol M ocurrió una disminución inicial y después de 15 días se observó un incremento que posteriormente se estabilizó hasta el final del almacenamiento. En los frutos almacenados a temperatura ambiente, la actividad de esta enzima se redujo en promedio.

Figura 3-16: Evolución de la actividad (UPOD= Δ Absorbancia a 436nm/min*g PF) promedio de la enzima peroxidasa en pulpa y cáscara de frutos de gulupa almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaques Control y Makropol M. Estados de madurez: 50% y 75% de cáscara púrpura. PF: Peso fresco del tejido. Barras indican error estándar (n=3).



Entonces, para ambos tejidos, se observó que la actividad de POD alcanzó niveles más bajos con el empaque Control que con Makropol M, mostrando entonces que durante el transcurso del almacenamiento este parámetro evolucionó en el tiempo de manera semejante en ambos empaques, pero los cambios durante esta evolución fueron menos acentuados en los frutos almacenados en Makropol M, esto es, se dieron en un menor rango (Figura 3-16).

Al final del almacenamiento de los tratamientos, se observó un efecto significativo de interacción entre temperatura, madurez y empaque, sobre la actividad de POD en pulpa ($F=29,07$; $p=0,000$) y cáscara ($F=33,44$; $p=0,000$). En el día final de almacenamiento de los frutos, tanto en la cáscara como en la pulpa de gulupa se observó que la actividad de POD en los frutos almacenados a temperatura ambiente disminuyó significativamente respecto a la inicial (Día cero), con excepción de los frutos con madurez del 75% empacados en Control y con madurez de 75% en Makropol M. En los frutos refrigerados, se observó que la actividad fue mayor en los empacados en Makropol M que en Control, siendo sólo estos últimos significativamente menores en Control en los frutos a 4°C con 50% de madurez en los que se encontraron niveles en promedio superiores a los de los demás frutos refrigerados en ese mismo empaque, siendo semejantes a los del empaque Makropol M.

Se encontró que la actividad de la POD en ambos tejidos de los frutos almacenados en Control, alcanzó niveles en general menores en los frutos refrigerados que a temperatura ambiente.

Se ha reportado que la actividad de la peroxidasa se incrementa durante el almacenamiento a bajas temperaturas, sugiriendo que este incremento hace parte del síndrome de daño por frío (Perez-Tello *et al.* 2001) cuando está acompañado del incremento en especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 (Carvajal *et al.* 2011). Es posible, que el incremento observado de la actividad de la POD en cáscara y pulpa de gulupa en el empaque Control, sea consecuencia de las bajas temperaturas asociadas a la prolongación del tiempo de almacenamiento, que puede estar indicando daño por frío a estas bajas temperaturas; sin embargo, se requieren futuros estudios de la evolución del contenido de H_2O_2 en el fruto de gulupa para confirmar dicha hipótesis.

Sin embargo se destaca que en el día final del almacenamiento, los frutos con madurez de 50% almacenados a 4°C en empaque Control presentaron una actividad POD en cáscara y pulpa superior a la de los demás tratamientos en ese mismo empaque, lo cual puede hacerlos más susceptible a un deterioro más rápido debido a que las altas actividades de esta enzima se han asociado con los inicios de la senescencia y deterioro del fruto (Baquero-Duarte *et al.* 2005). De hecho, Baquero-Duarte *et al.* (2005) sugieren que los tratamientos poscosecha que se apliquen a los frutos, deben enfocarse en estimular la actividad de CAT y disminuir o inhibir la actividad de POD para que se puede asegurar un prolongación de la vida útil del fruto, lo cual es todo lo opuesto a lo observado en los frutos de 50% de madurez a 4°C en empaque Control.

En los frutos almacenados en empaque Control y a temperatura ambiente en Makropol M, se observó la disminución de la actividad POD conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento. En estos frutos, los resultados muestran que a partir del día 6 de almacenamiento la actividad de la POD en cáscara y pulpa como el contenido de fenoles en cáscara disminuyeron, favoreciendo la oxidación del fruto de gulupa y su consecuente senescencia (Figuras 3-16 y 3-14).

3.2.6 Catalasa

La actividad de la catalasa (CAT) en pulpa y en cáscara presento tendencias diferentes. En la pulpa del fruto de gulupa, durante el transcurso del tiempo, en general ocurrió una disminución de la actividad de CAT, siendo mayor esta disminución en los frutos refrigerados que a temperatura ambiente, y se observó que la velocidad de disminución de la actividad de esta enzima, fue menor en los frutos empacados en Makropol M con respecto a los empacados en Control (Figura 3-17 y Tabla 3-1).

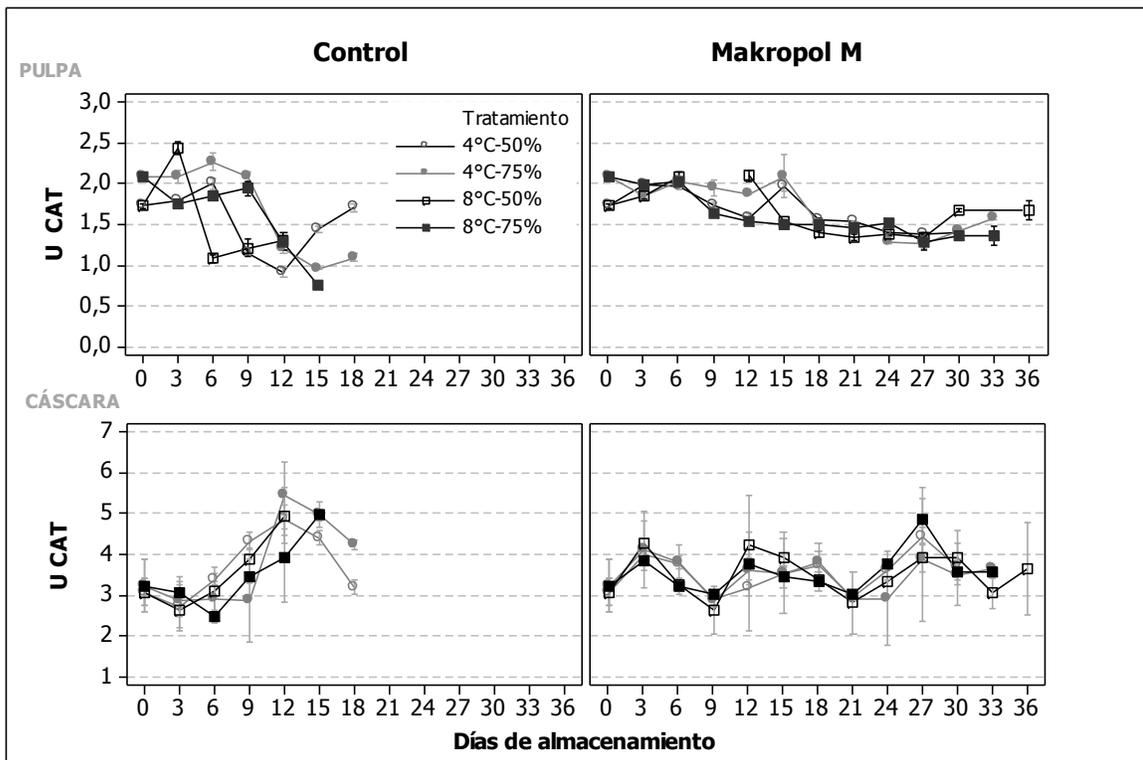
En cáscara, se observó que la actividad de CAT se incrementó durante el almacenamiento en los frutos empacados en Control, en tanto que la actividad de esta enzima en Makropol M osciló en el trascurso del tiempo (Figura 3-17 y Tabla 3-1).

La actividad de esta enzima en el día final de almacenamiento de todos los tratamientos, presentó interacción significativa entre los 3 factores evaluados, tanto en cáscara ($F=56,57$; $p=0,000$) como en pulpa ($F=24,51$; $p=0,000$). En cáscara, al día final de

almacenamiento se encontró que las actividades de CAT en general fueron superiores que las observadas en el día inicial (Día cero), siendo las obtenidas en Control mayores a las obtenidas en Makropol M. Se destacó sin embargo, que en el día final, en los frutos de 50% de madurez a 4°C en Control la actividad de CAT fue mucho más baja, incluso fue semejante a la inicial.

Por su parte en pulpa, en el día final de almacenamiento de todos los tratamientos, en general se encontró menor actividad de la catalasa respecto a la encontrada en el inicio de experimento (Día cero), siendo en el empaque Control menores los valores que en Makropol M. Particularmente, se observó que la actividad de CAT alcanzada por todos los tratamientos con empaque Makropol M fue semejante entre sí, mientras que en Control se observó que entre frutos refrigerados la actividad fue mayor a 4°C que a 8°C y fue mayor en frutos de 50% que en frutos de 75% de madurez, e inclusive, los frutos con 50% de madurez a 4°C tuvieron actividad de CAT semejante a la del día inicial (Día cero).

Figura 3-17: Evolución de la actividad (UCAT= μmol de H_2O_2 descompuesto/ $\text{min}\cdot\text{g}$ PF) promedio de la enzima catalasa en pulpa y cáscara de frutos de gulupa almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaques Control y Makropol M. Estados de madurez: 50% y 75% de cáscara púrpura. PF: Peso fresco del tejido. Barras indican error estándar ($n=3$).



Un comportamiento semejante al encontrado en el empaque Control, se ha reportado en frutos de zuchinni, en donde el comportamiento de cáscara y pulpa de zuchini fue observado respectivamente en pulpa y cáscara de gulupa. De manera que en los frutos de zuchinni en condiciones de bajas temperaturas de 0°C y 10°C, se ha encontrado que la actividad de CAT (en base a peso seco) en pulpa se incrementó en los primeros 5 días de almacenamiento y luego disminuyó alcanzando niveles menores que en el día inicial (Día cero), mientras que en cáscara hubo un incremento que llegó al doble en el día 5, seguido de una disminución (Gualanduzzi *et al.* 2009).

En semejanza al comportamiento encontrado en la pulpa de los frutos de gulupa, Baquero-Duarte *et al.* (2005) mencionan que en cáscara de pitaya, la actividad de la CAT es alta en los primeros días del almacenamiento, luego de lo cual se reduce; y que la actividad máxima es coincidente con el climaterio y con el desarrollo del color, luego de lo cual es significativamente menor en los frutos senescentes. De forma similar, en la pulpa de frutos de mango se ha encontrado que la actividad de la catalasa sin importar el estado de madurez del fruto ni la temperatura, incrementa en los primeros días de almacenamiento y luego disminuye hasta el final del almacenamiento (Arafat 2005). Imahori *et al.* (2008) también encontraron que, en el pericarpo de frutos de *Prunus mume* refrigerados a 1°C, la catalasa se incrementó en el inicio y posteriormente disminuyó en el día 5 hasta el día 15 de almacenamiento. De forma similar, en la pulpa de frutos de mango se ha encontrado que la actividad de CAT sin importar el estado de madurez del fruto ni la temperatura de almacenamiento, incrementa en los primeros días de almacenamiento y luego disminuyó hasta el final del almacenamiento (Arafat 2005).

En frutos de pepino cohombro (*Cucumis sativus* L.) refrigerados a 5°C se encontró un comportamiento semejante al observado en cáscara de gulupa, de manera que en los primeros días del almacenamiento ocurrió una leve disminución de CAT seguida de un incremento significativo en el quinto día (Sri-laong & Tatsumi 2003).

Al final del almacenamiento, la actividad de CAT en cáscara se incrementó en promedio por efecto de las bajas temperaturas respecto a los frutos a temperatura ambiental, encontrándose a 8°C una mayor actividad que a 4°C, de manera que es posible que las menores actividades de CAT a 4°C ocasionen la reducción de la actividad antioxidante disminuyendo la tolerancia de los frutos de gulupa al daño por frío, particularmente en los

frutos con 50% de madurez a 4°C en empaque Control, en los que hubo un actividad significativamente menor de CAT. Adicionalmente se ha reportado que el daño por frío está relacionado con una menor actividad de CAT respecto de las frutas no refrigeradas (Baquero-Duarte *et al.* 2005). En consecuencia, 8°C tiene una mayor capacidad antioxidante que pudiera prolongar la vida útil del fruto.

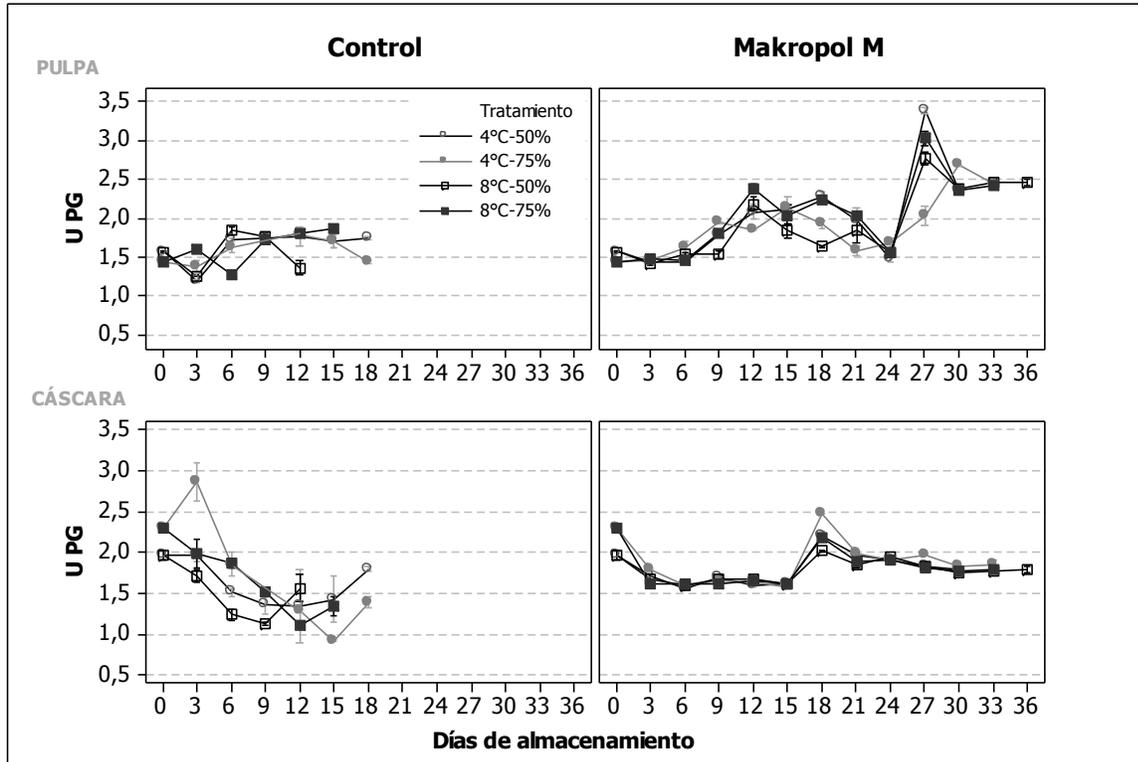
3.2.7 Poligalacturonasa

En el día inicial del experimento, la actividad de la poligalacturonasa (PG) fue menor en los frutos de gulupa con 50% de madurez, respecto a aquellos en estado del 75% de madurez (Tabla 3-1). Esta menor actividad de la PG en frutos con menor estado de madurez ya se ha reportado en otros frutos como durazno (Brummell *et al.* 2004), guayaba, tomate, papaya y mango (Ali *et al.* 2004b).

La actividad de PG presentó comportamientos distintos en los diferentes tejidos del fruto de gulupa. En cáscara la actividad PG se comportó de manera idéntica que la actividad de la POD en cáscara (Figuras 3-18 y 3-16, Tabla 3-1, Anexo C), tanto en su evolución en el tiempo, como en el comportamiento al día final de almacenamiento, en el cual se vio efecto de interacción entre los factores temperatura, madurez y empaque ($F=35,43$; $p=0.000$) (ver descripción de la actividad POD en cáscara). Además esta actividad PG en cáscara se comportó semejante a las concentraciones de fenoles y azúcares reductores en cáscara (Figuras 3-18, 3-14 y 3-13, Tabla 3-1, Anexo C).

La reducción de la actividad PG observada en cáscara de los frutos de gulupa, con el almacenamiento a bajas temperaturas, también ha sido reportada para el exocarpo de frutos de zucchini (*Cucurbita pepo* L.) que fueron almacenados a 4°C (Carvajal *et al.* 2011). Adicionalmente se ha encontrado que a temperatura de 3°C, la cual conlleva a daño por frío en frutos de tomate, ocasiona la reducción de los transcriptos, de la actividad, y de la acumulación de PG en comparación con temperatura ambiente, sugiriendo además que esta temperatura de 3°C tiene un efecto en la regulación post-transcripcional de la expresión génica de PG, por lo cual disminuyen la traducción de proteína PG y/o incrementa la estabilidad de la PG, como también tiene un efecto transcripcional (Rugkong *et al.* 2010).

Figura 3-18: Evolución de la actividad (UPG= μg glucosa/min* g PF) promedio de la enzima poligalacturonasa en pulpa y cáscara de frutos de gulupa almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaques Control y Makropol M. Estados de madurez: 50% y 75% de cáscara púrpura. PF: Peso fresco del tejido. Barras indican error estándar ($n=3$).



En tanto que en la pulpa, la actividad de la PG en el empaque Control mostró con el transcurso del tiempo un comportamiento con tendencia al incremento de la actividad. Y de manera semejante la actividad PG en el empaque Makropol M mostró una tendencia de incrementar en los primeros 15 días, para todas las temperaturas, pero en los frutos refrigerados se observó que después de ese día ocurrió una reducción regresando a los niveles iniciales (Día cero) en el día 24 y después ocurrió un incremento que se estabilizó después del día 30 de almacenamiento (Figura 3-18 y Tabla 3-1).

Respecto a la actividad de PG de la pulpa en el día final de almacenamiento de todos los tratamientos, se encontró un efecto significativo de interacción entre temperatura, madurez y empaque ($F= 43,79$; $p=0,000$). Destacándose que la mayor actividad de PG se presentó en los frutos refrigerados (4°C y 8°C) en empaque Makropol M.

Se ha asociado el incremento de la actividad de PG con el *ripening* del fruto, de manera que la actividad sigue incrementándose a medida que el fruto se sobremadura, por ello el rol de esta enzima se relaciona principalmente con cambios texturales y propiedades de calidad, y finalmente con el deterioro del fruto para permitir o promover la dispersión de semillas (Brummell & Harpster 2001). La actividad de PG se ha encontrado alta en algunos frutos como aguacate y tomate y baja en otros como manzana y durazno; sin embargo, incluso los bajos valores de actividad de esta enzima pueden ser suficientes para ocasionar el desensamblaje de las pectinas (Hadfield & Bennet 1998, Protsenko *et al.* 2010). En tomate, la actividad exo-PG permanece constante durante la maduración, en tanto que en el durazno es regulada durante el *ripening* (Hadfield & Bennet 1998). En melón y durazno la actividad PG incrementa relativamente tarde en *ripening*, y por consiguiente la despolimerización de las pectinas ocurre tardíamente en la maduración; en tanto que en aguacate y tomate la actividad PG aumenta justo después del inicio de la maduración y la despolimerización de las pectinas ocurre entonces durante todo el proceso de *ripening* (Brummell & Harpster 2001).

El control de la actividad de esta enzima es un punto clave de relevancia para la regulación del almacenamiento de los frutos y de su calidad (Protsenko *et al.* 2010). La supresión de PG tiene efecto modesto en el ablandamiento del fruto (Hadfield & Bennet 1998); sin embargo, la reducción o inhibición de la actividad de PG puede mejorar algunas propiedades físicas con implicaciones en los factores poscosecha como el incremento en el tiempo de vida de anaquel, y la resistencia al rajamiento y a patógenos durante la poscosecha, lo cual se debe al mejoramiento de la integridad de los tejidos. Por consiguiente, la supresión o reducción de PG mejoraría la integridad del fruto almacenado y las propiedades de textura de la pulpa sin afectar otros atributos de calidad como el color, pH y valores de °Brix (Hadfield & Bennet 1998, Brummell & Harpster 2001, Goulao & Oliveira 2008).

La alta actividad de PG encontrada en los frutos refrigerados en Makropol M, al final del almacenamiento, es superior con respecto a temperatura ambiental en este mismo empaque y a los tratamientos en el empaque Control, lo cual puede indicar que después del período de almacenamiento de 30 días pudieran encontrarse cambios texturales en pulpa y cáscara relacionados con el ablandamiento producto de la alta actividad de esta enzima. Ya en *Passiflora edulis* se ha encontrado que la alta actividad de PG está

asociada con la degradación de sustancias pécticas estructurales en el arilo y en la cáscara del fruto maduro (Pruthi 1963), asociándose con la maduración y deterioro de los frutos de maracuyá (Menéndez-Aguirre *et al.* 2006).

En el día final del almacenamiento, se observó que los frutos con 50% de madurez almacenados a 4°C en empaque Control presentaron una significativamente mayor actividad de PG, que los demás frutos refrigerados en dicho empaque. Considerando que se ha reportado que la baja actividad de PG está correlacionada con una mayor resistencia del fruto al frío (Carvajal *et al.* 2011), entonces es posible que la alta actividad de PG observada en los frutos con 50% de madurez almacenados a 4°C en empaque Control, les confiera una mayor susceptibilidad al frío.

3.3 Parámetros fisicoquímicos

Las determinaciones se realizaron en empaque Control bajo las tres temperaturas de ensayo, y para los dos estados de madurez del fruto de gulupa

3.3.1 Pérdida de peso

En los frutos de gulupa, se observó que la pérdida de peso fresco se incrementó proporcionalmente con el transcurso del tiempo, alcanzando en los frutos en condiciones de temperatura ambiente tasas diarias de pérdida de peso de 1,20% y 1,06%, con madurez de 50% y 75%, respectivamente. Las cuales fueron significativamente mayores a las de los frutos refrigerados (Tabla 3-2 y Figura 3-19). Y entre éstos últimos, a pesar que no hubo diferencia significativa, se observó mayor tasa de pérdida en los frutos a 8°C que a 4°C, siendo respectivamente de 0,50% y 0,33% en los frutos con madurez del 50% y de 0,32% y 0,21% en los de 75% de madurez (Figura 3-19).

Los anteriores resultados son similares a los reportados por Shiomi *et al.* (1996b) quien ha reportado un incremento lineal con el transcurso del tiempo de almacenamiento en frutos de gulupa de distinto estado de madurez almacenados a temperatura ambiente (25°C). También los resultados son semejantes a lo reportado por Aular *et al.* (2001) en maracuyá, en donde con el aumento del tiempo de almacenamiento se incrementó la pérdida de masa, y se encontró que en los frutos almacenados en condiciones

ambientales sin empaque y con temperatura promedio de $24\pm 4^{\circ}\text{C}$, la pérdida de peso acumulada fue del 16,77% en el día 12.

Tabla 3-2: Promedios (\pm SD) de los parámetros fisicoquímicos de los frutos de gulupa antes de aplicar los tratamientos (condiciones iniciales: cosecha) y al final del almacenamiento (último día del almacenamiento) en condiciones de temperatura ambiental ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$), en empaque Control. Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) según la prueba de diferencias mínimas significativas de Fischer. LSD: Diferencia mínima significativa.

	COSECHA		ALMACENAMIENTO		LSD	
	Madurez	50%	75%	50%		75%
Pérdida de peso ¹		0,0 \pm 0,0 c	0,0 \pm 0,0 c	6,7 \pm 0,9 a	3,2 \pm 0,3 b	0,8
L* ²		42,3 \pm 0,7 a	36,9 \pm 0,3 b	34,9 \pm 0,5 c	33,8 \pm 0,8 c	1,1
C* ³		11,4 \pm 1,1 a	8,4 \pm 0,2 b	10,3 \pm 0,4 a	6,8 \pm 0,4 c	1,2
h ⁴		64,8 \pm 4,1 a	51,7 \pm 1,3 b	27,2 \pm 1,4 c	43,7 \pm 11,2 b	11,4
pH		2,9 \pm 0,02 a	2,7 \pm 0,11 b	2,8 \pm 0,02 a	2,9 \pm 0,05 a	0,1
SST ⁵		15,8 \pm 0,2 a	14,7 \pm 0,2 a	13,0 \pm 0,4 b	12,3 \pm 1,1 b	1,1
ATT ⁶		3,4 \pm 0,12 b	3,3 \pm 0,09 b	2,8 \pm 0,02 c	4,7 \pm 0,08 a	0,2
IM ⁷		4,7 \pm 0,2 a	4,4 \pm 0,1 a	4,6 \pm 0,1 a	2,7 \pm 0,3 b	0,4

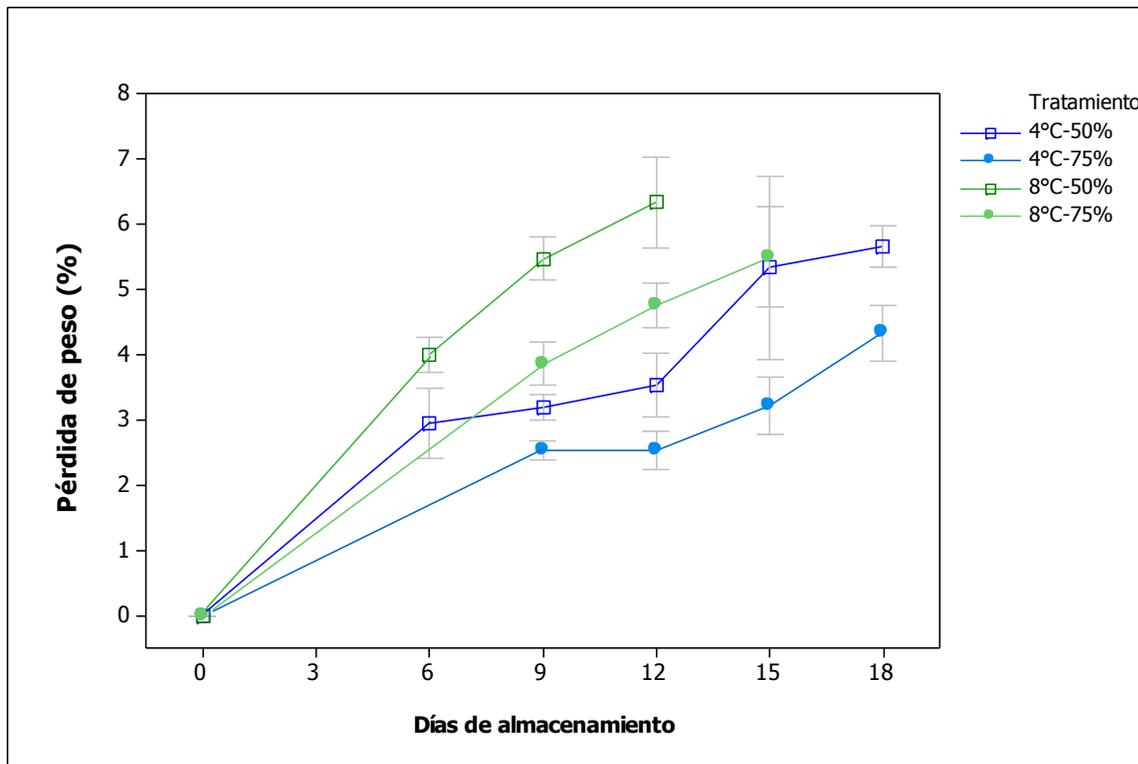
¹ Porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado (%), ² luminosidad del color, ³ saturación del color, ⁴ tono del color, ⁵ sólidos solubles totales ($^{\circ}\text{Brix}$), ⁶ acidez total titulable (% de ácido cítrico), ⁷ índice de madurez (SST/ATT).

A pesar que no es estadísticamente significativa, la pérdida de peso es en promedio mayor en los frutos con 50% respecto a los de 75% de madurez (Tabla 3-2 y Figura 3-19). Esta mayor pérdida de peso en los frutos de menor estado de madurez, ya se ha reportado en frutos de gulupa, indicando que esto se debe probablemente a que los frutos menos maduros tienen una mayor tasa metabólica y mayor relación de área superficial por volumen (Shiomi 1996b).

La mayor pérdida de peso con el incremento de la temperatura de almacenamiento se debe al mayor metabolismo a mayores temperaturas, en las que al aumentar la transpiración se incrementa la pérdida de agua. Y de manera semejante, en gulupa, Kishore *et al.* (2011) han reportado que durante el almacenamiento de frutos de gulupa a cuatro temperaturas (ambiente, 6, 8 y 11°C), se encontró que la tasa de pérdida fisiológica de peso se incrementó con el aumento de la temperatura de almacenamiento y

que el contenido de jugo en el fruto se correlacionó directamente con la temperatura, siendo mayor en los frutos a temperatura ambiente, lo cual puede deberse a la alta tasa de pérdida de peso en estos. Además reportan que la calidad del fruto se pierde rápidamente a los 5 días cuando está almacenado a temperatura ambiente, pero que a 8°C la calidad se mantiene adecuada hasta por 21 días, de manera que esta temperatura de almacenamiento se recomienda para la gulupa respecto al mantenimiento satisfactorio de su calidad sensorial.

Figura 3-19: Porcentaje promedio (n=3) de pérdida de peso en frutos de gulupa almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaque Control. Estados de madurez: 50% y 75% cáscara púrpura. Las barras indican error estándar.



En general, no hubo diferencias significativas en la tasa diaria de pérdida de peso debidas al estado de madurez, para ninguna temperatura de almacenamiento. Sin embargo, debido a los diferentes tiempos de almacenamiento de los frutos de gulupa en los tratamientos de almacenamiento, la pérdida de peso acumulada en el final del almacenamiento en los frutos a temperatura ambiente, fue del doble con el 50% que con el 75% de madurez, pero esto se debe a que a pesar que los frutos de ambos estados

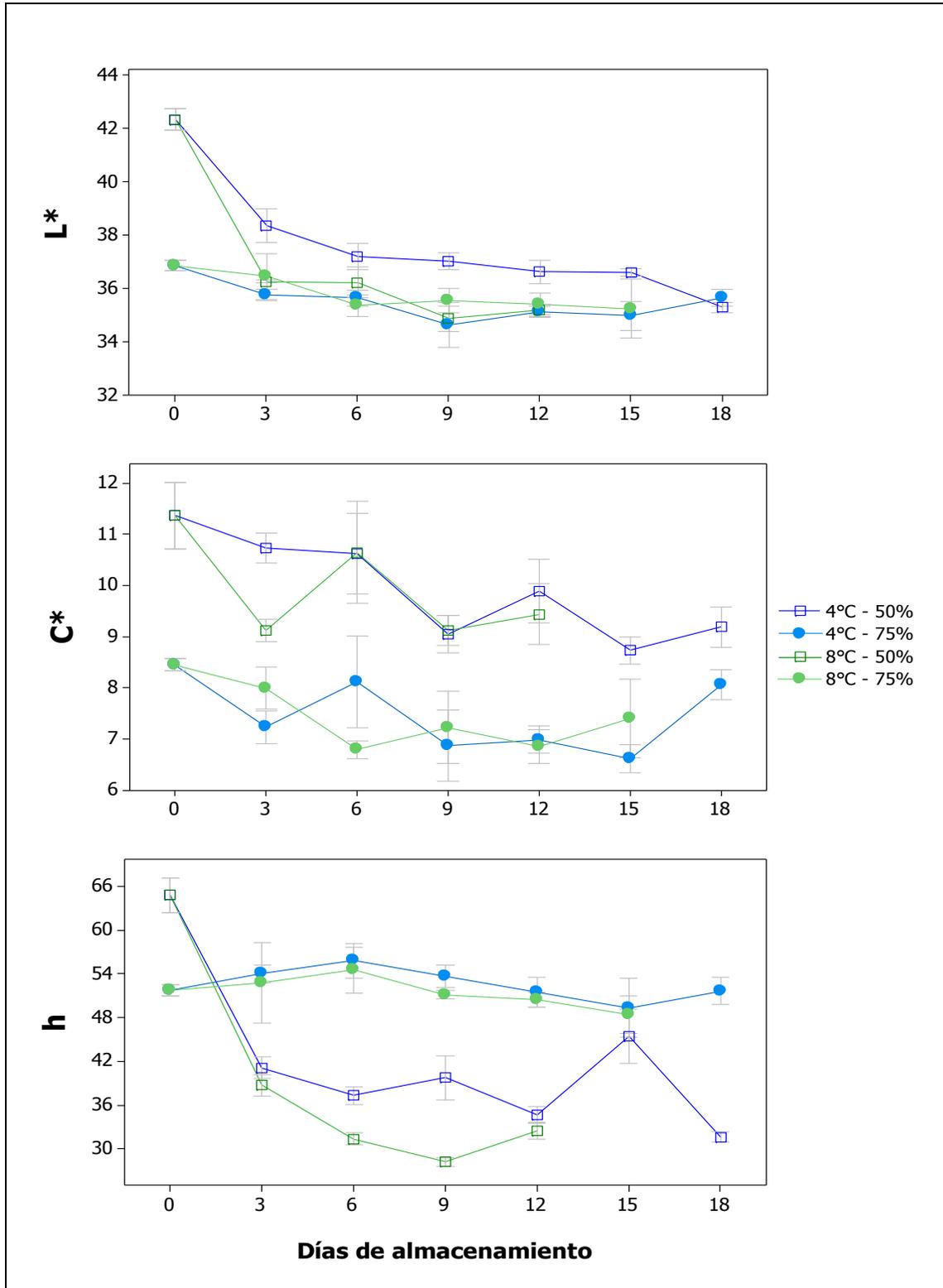
presentaron una tasa semejante de pérdida de peso, aquellos con mayor estado de madurez perdieron su buena apariencia externa más prontamente que los frutos menos maduros, a los 3 y a los 6 días respectivamente (Tabla 3-2). En tanto que en los frutos refrigerados, la pérdida de peso acumulada al final del almacenamiento mostró diferencias significativas debidas al estado de madurez ($F=20,12$; $p= 0,001$), pero no presentó diferencias estadísticamente significativas debidas a la temperatura. De manera que se encontró que los frutos refrigerados con 50% de madurez perdieron en promedio (6.2%) mayor peso respecto a los frutos que fueron cosechados con 75% de madurez (4.3%) (Figura 3-19).

3.3.2 Color

Con el transcurso del almacenamiento de los frutos a temperatura ambiente, se disminuyó la luminosidad del color, indicando que se volvieron más oscuros debido a la evolución del color tono verde claro que es más luminoso a uno púrpura que es más oscuro. Además, la saturación disminuyó significativamente en los frutos con 75% de madurez mientras el tono permaneció constante, en tanto que en los frutos con madurez de 50% el tono se redujo, lo cual se asocia en estos últimos al cambio de coloración a púrpura de la cáscara. De esta manera, al finalizar el almacenamiento de estos frutos, aquellos con 50% de madurez presentaron mayor saturación, menor tono e igual luminosidad que los de 75% de madurez (Tabla 3-2 y Figura 3-20). Lo anterior evidencia que al final de almacenamiento, los frutos con 50% de madurez habían progresado en el cambio de color al tono púrpura y que los cambios obtenidos en este momento por los frutos con 75% de madurez se debieron no a variación en el tono sino en la saturación del color.

Para el día final del almacenamiento, la luminosidad del color no fue afectada significativamente por el estado de madurez del fruto, en tanto que si hubo un efecto significativo de este factor sobre la saturación ($F=34,57$; $p=0,000$) y el tono del color ($F=50,72$; $p=0,000$). De manera que al final del almacenamiento, los frutos con 50% de madurez presentaron significativamente mayor saturación y menor tono del color respecto a los de 75% de madurez, en todas las temperaturas (Figura 3-20 y Tabla 3-2).

Figura 3-20: Promedios de la luminosidad (L^*), saturación (C^*) y tono (h) del color de la cáscara de frutos de gulupa almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ y $8\pm 2^\circ\text{C}$ en empaque control. Estados de madurez: 50% y 75% púrpura. Barras indican error estándar ($n=3$).



Entonces el cambio de los parámetros del color logrado al finalizar el almacenamiento de los frutos, ocurrió de forma similar en los refrigerados con respecto a los almacenados a temperatura ambiente; sin embargo, se presentó en mayor magnitud en éstos últimos. Es así, que se observó que el tono logrado al final del almacenamiento fue en promedio mayor en los frutos refrigerados respecto a los almacenados a temperatura ambiente, lo cual evidencia que los frutos refrigerados presentaron menor cambio de tono hacia la coloración púrpura que el logrado por los frutos a temperatura ambiente (Figura 3-20 y Tabla 3-2). Adicionalmente, en el día final del almacenamiento no hubo diferencias significativas entre las temperaturas de 4°C y 8°C sobre el color alcanzado por los frutos (Figura 3-20).

El mayor cambio de color de los frutos almacenados a mayor temperatura, que desarrollaron más rápidamente el color hacia un tono púrpura oscuro respecto a los frutos refrigerados, se debe a que las mayores temperaturas de almacenamiento resultan en una maduración más rápida y en una mayor acumulación de antocianinas (Shin *et al.* 2007) que son las responsables del color púrpura de la cáscara de la gulupa.

Respecto al color en el día inicial, en el que se evaluaron las condiciones previas a la aplicación de los tratamientos, se encontró que al finalizar el período de almacenamiento todos los frutos presentaron significativamente menor luminosidad, excepto aquellos con 75% de madurez almacenados a 4°C. En tanto que la saturación disminuyó significativamente en los frutos a bajas temperaturas con 50% de madurez y a temperatura ambiente con 75% de madurez, y el tono disminuyó de manera significativa únicamente en los frutos con madurez del 50% (Figura 3-20). Por lo cual se soporta la afirmación de que con el transcurso del almacenamiento, se presentó un cambio de color hacia el tono púrpura en los frutos con madurez del 50% en condiciones de refrigeración a 4°C y a 8°C, y que en general los frutos almacenados en refrigeración y a temperatura ambiente se tornaron más oscuros, mostrando que hubo progreso del cambio de color en los frutos bajo todos los tratamientos de almacenamiento, como lo confirman las fotografías (ver Anexo B). Esta disminución en la luminosidad ya ha sido reportada en frutos de gulupa, en los cuales ocurre un oscurecimiento a medida que maduran (Flórez 2012).

El cambio del color de la cáscara del fruto durante la maduración es una característica notoria en la gulupa, de manera que su cáscara pasa de tonalidades verdes claras a púrpura oscuro, esta transición está asociada con la degradación de las clorofilas que ocurre durante la maduración y senescencia del fruto, lo cual permite la visualización de los pigmentos tipo antocianinas que le confieren el color púrpura a la cáscara. Este cambio durante la maduración de la gulupa ya ha sido reportado por Flórez (2012).

El etileno se ha asociado con el desarrollo del color en los frutos, al desencadenar la transducción de numerosos factores de transcripción que a su vez activan genes ocasionando la degradación de las clorofilas y el desarrollo de pigmentos (Payasi & Sanwal 2010). Considerando lo anterior, el menor cambio de color observado en los frutos refrigerados de gulupa, se debe a que a bajas temperaturas la producción de etileno se redujo (como se discutió en los resultados de respiración), de manera que la se podría retardar la degradación de clorofilas y con ello el poder visualizar pigmentos tipo antocianinas que es el responsable del cambio de color de la cáscara de la gulupa de verde a púrpura.

3.3.3 pH, ATT, SST e IM

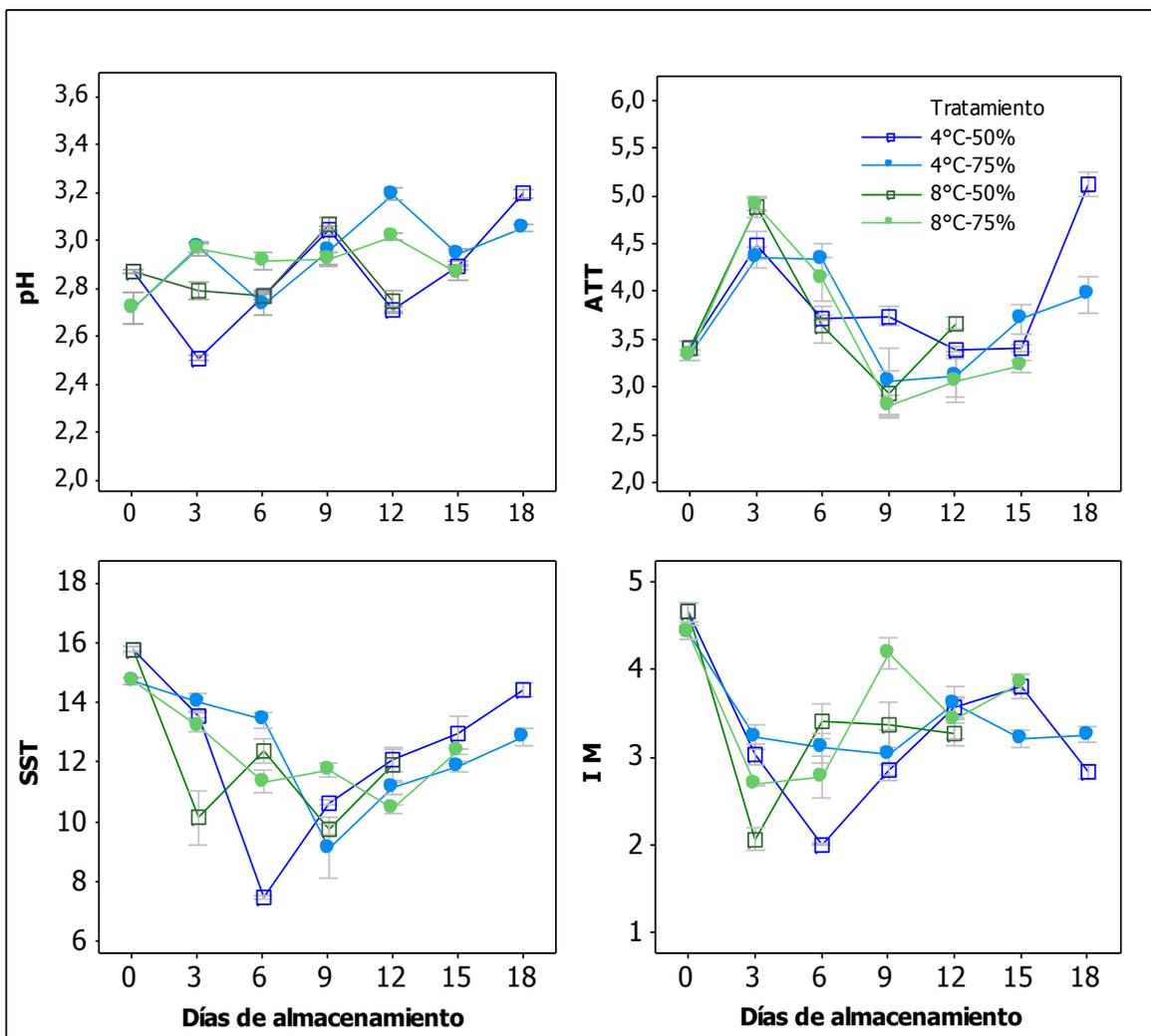
pH

El pH de la pulpa, medido al finalizar el almacenamiento, presentó una interacción entre temperatura y madurez ($F=12,21$; $p=0,001$) de manera que se observó que los frutos almacenados a 4°C finalizaron su almacenamiento con un pH significativamente mayor con respecto al alcanzado a 8°C y a temperatura ambiente, además, a 4°C el pH fue superior en los frutos con menor estado de madurez, en los que se alcanzó un pH de 3,2, respecto al pH de 3,0 en los frutos con 75% de madurez (Figura 3-21 y Tabla 3-2).

Comparando el pH con las condiciones iniciales (Día cero), se encontró que al final del almacenamiento este se incrementó significativamente en los frutos con 75% de madurez en las tres temperaturas evaluadas, y no varió en los frutos con 50% de madurez excepto en los almacenados a 4°C en los que se observó un incremento (Tabla 3-2 y Figura 3-21).

Un incremento del pH durante el almacenamiento a temperatura ambiente de frutos de gulupa con 50% y 70% de madurez también ha sido reportado por Jiménez *et al.* (2011) y Flórez (2012). Adicionalmente, Martínez (2010) también reportó este incremento del pH durante el almacenamiento de frutos de gulupa de 70-80% de madurez sin empaque a 8°C. De manera que ambos autores indicaron que este incremento del pH es consecuencia de la disminución de la acidez; sin embargo, Flórez (2012) indicó que el cambio leve en el pH puede sugerir que la pulpa del fruto de gulupa puede tener una buena capacidad amortiguadora.

Figura 3-21: Promedios de pH, ATT (% de ácido cítrico), SST (°Brix) e IM (SST/ATT) de la pulpa de frutos de gulupa almacenados a 4±2°C y 8±2°C. Estados de madurez: 50%, 75% y 100% púrpura. Barras indican error estándar (n=3).



ATT

En la evolución en el tiempo de la acidez total titulable (ATT) durante el transcurso del almacenamiento, se observó que incrementó en el día 3 de almacenamiento para todos los estados de madurez y temperaturas, luego de lo cual disminuyó (Figura 3-21 y Tabla 3-2). Un comportamiento similar se ha reportado en la maduración de frutos de anonáceas, los cuales también son climatéricos, tropicales y presenta altas tasas de respiración y producción de etileno, en los cuales se ha observado un incremento de ácidos málico y cítrico de 3 a 4 días después de la cosecha, luego de lo cual disminuyen, encontrándose un incremento de la acidez en la etapa inicial de la maduración organoléptica seguida de una reducción, de manera que este incremento en la acidez se ha relacionado con la producción de ácidos en *Annona muricata* y *A. cherimola* (Pareek *et al.* 2011). Sin embargo, los niveles de ácido cítrico y málico en los frutos de gulupa no se incrementaron en el día 3 (Figura 3-11).

Además, se observó que las condiciones de ATT al finalizar el almacenamiento de los frutos a 4°C se incrementaron respecto a los niveles iniciales de los frutos antes de la aplicación de los tratamientos, en tanto que a 8°C finalizaron en niveles semejantes (Figura 3-21). Estos resultados son contrastantes con lo reportado por Martínez (2010), quien encontró en frutos de gulupa con madurez del 70-80%, almacenados sin empaque y a 8°C, que se redujeron los niveles de ATT al finalizar el almacenamiento con respecto a los niveles iniciales, sin embargo la tendencia general de la evolución en el tiempo fue semejante, encontrando un leve incremento en la primera semana seguido de la disminución de la ATT.

Este comportamiento de incremento inicial, y reducción después del día tres, en las tres temperaturas de almacenamiento, ha sido reportado en frutos de *Manilkara zapota* por Miranda *et al.* (2002) y Dantas de Morais *et al.* (2008) quienes explican que la reducción de ATT durante el almacenamiento se debe al uso de los ácidos orgánicos como sustratos respiratorios o para la conversión en azúcares.

Con respecto a las condiciones de ATT alcanzadas al final de almacenamiento para los tratamientos evaluados, se observó que hubo un efecto significativo de interacción entre temperatura y madurez ($F=118,02$; $p=0,000$) sobre la ATT, encontrando que en los frutos

de gulupa refrigerados la ATT fue mayor a menor estado de madurez, en tanto que a temperatura ambiente la tendencia fue opuesta (Figura 3-21 y Tabla 3-2).

Es importante destacar que la variación de ATT no está directamente relacionada con el pH, debido a que este último depende de la concentración de hidrogeniones libres y además de la capacidad amortiguadora del pH de la pulpa (Dantas de Morais *et al.* 2008) del fruto.

SST

Durante el almacenamiento de los frutos de gulupa, se observó que los sólidos solubles totales (SST) de la pulpa disminuyeron en todos los tratamientos con respecto a los niveles que tenían en las condiciones iniciales, esto es en las condiciones de partida antes de aplicar los tratamientos (Tabla 3-2 y Figura 3-21).

La disminución de los SST con el transcurso del tiempo de almacenamiento, se debe a que con la maduración del fruto, en general se consumen azúcares y ácidos orgánicos, como sustratos respiratorios, consumiéndose en la glicólisis y en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, de manera que sus concentraciones se reducen. Este comportamiento ya se ha reportado para frutos de gulupa provenientes de Cundinamarca, con 50%, 70% y 100% de madurez durante el almacenamiento poscosecha a temperatura ambiente (Flórez 2012), y también en frutos de gulupa cosechados a los 70, 80 y 90 días después de la floración que fueron almacenados a 25°C (Shiomi 1996b). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado, Martínez (2010) reportó aumento de SST con el transcurso del almacenamiento en frutos de gulupa a 8°C sin empaque.

Estos resultados indican que el contenido de SST, el cual se atribuye principalmente a azúcares, se reduce después de la cosecha, de manera que no existe en los frutos de gulupa una acumulación de azúcares después de la cosecha o durante de la poscosecha. Esa reducción en el contenido de SST indica que estos están siendo empleados en la respiración mucho más rápidamente de lo que son producidos (Dantas de Morais *et al.* 2008).

Supapvanich *et al.* (2011) han observado un descenso en los SST del día cero al cuatro durante el almacenamiento de frutos de *Syzygium samarangense* [Blume] Merrill & L.M.

Perry, y sugieren que este descenso puede estar relacionado con la biosíntesis de antocianinas, esto es, con el incremento en su contenido.

Al finalizar el período de almacenamiento, se encontró que la temperatura afectó significativamente ($F=7,37$; $p= 0,008$) el contenido de SST, de manera que se observó un incremento significativo en los frutos sometidos a 4°C respecto a 8°C; sin embargo, ninguno fue diferente de los contenidos encontrados al final del almacenamiento en temperatura ambiente, excepto los frutos de 50% de madurez almacenados a 4°C (Tabla 3-2 y Figura 3-21).

Estos resultados son contrarios a lo esperado puesto que a mayores temperaturas se esperaría un metabolismo más acelerado, y por tanto una mayor reducción de los SST a temperatura ambiente, como ya lo han reportado Kishore *et al.* (2011) en frutos de gulupa, indicando menores niveles de SST al final del almacenamiento con temperatura ambiente y 11°C respecto a 6°C y 8°C.

IM

El índice de madurez (IM) se define como un parámetro de calidad que es una medida del balance dulce/ácido de la pulpa del fruto de gulupa y se calculó como la razón SST/ATT. En general, el comportamiento durante el transcurso del tiempo de almacenamiento del IM fue opuesto al de la ATT, encontrándose una reducción inicial del IM en el día 3, seguida de un incremento, y para los frutos a 4°C seguida por una disminución en el día 18 (Tabla 3-2 y Figura 3-21). Una tendencia de evolución en el tiempo muy similar a esta, fue reportada por Martínez (2010) en frutos de gulupa de 70-80% de madurez almacenados a 8°C sin empaque, y proveídos por Ocati S.A., quien encontró que los frutos disminuyeron el IM en la primera semana, luego de lo cual se incrementó en la segunda y se redujo en la tercera, de manera que al cabo del tiempo de almacenamiento el IM aumentó respecto a las condiciones del día de inicio del experimento.

Sin embargo, en general, comparando las condiciones iniciales de los frutos y las condiciones al final del almacenamiento, se observó que el IM de los frutos de gulupa disminuyó significativamente al finalizar el almacenamiento excepto en los frutos de 50% de madurez a temperatura ambiente en los que el IM permaneció constante. Pero, en el

presente estudio la disminución del IM en los frutos con 75% de madurez a temperatura ambiente se debe a que en el día final del almacenamiento de ese tratamiento que correspondió al día 3 de almacenamiento, hubo un drástico incremento de la ATT (Tabla 3-2).

Estos resultados son opuestos a los reportados para la pulpa de los frutos de gulupa, en donde se ha encontrado el incremento del IM durante la poscosecha en frutos almacenados a temperatura ambiente provenientes de Cundinamarca con estados de madurez del 50% y 75% (Flórez 2012) y en frutos con madurez de 70-80% que fueron suministrados por Ocati S.A. y almacenados a 8°C sin empaque (Martínez 2010).

En el día final del almacenamiento, el IM de los frutos de gulupa presentó una interacción significativa entre temperatura y madurez ($F=82,08$; $p=0,000$), de manera que en general el IM en el final del almacenamiento se incrementó con el aumento de la temperatura de almacenamiento, con excepción de los frutos con 75% de madurez almacenados a temperatura ambiente que presentaron el menor IM de todos los tratamientos (Figura 3-21 y Tabla 3-2).

Consideraciones finales

El comportamiento en la evolución de los parámetros fisiológicos fue muy semejante en frutos con 50% y 75% de madurez, sólo destacándose durante el almacenamiento a temperatura ambiental el mayor pico de respiración y de etileno en los frutos con madurez del 50%. A pesar de esta diferencia, el comportamiento en la evolución de la pérdida de peso, y la vida posrecolección con buena apariencia del fruto, fue muy similar entre los dos estados de madurez evaluados.

Con respecto a la temperatura, se observó que las bajas temperaturas tuvieron un efecto de reducir la tasa respiratoria de los frutos de gulupa, además, también ocasionaron que la producción de etileno se redujera de tal manera que no fue detectada en los frutos refrigerados. Como consecuencia, estos resultados reflejaron que las bajas temperaturas de almacenamiento ocasionaron una reducción en el metabolismo de los frutos de gulupa.

Sin embargo, en condiciones sin empaque, se evidenció que con el almacenamiento a temperatura de 4°C se ocasionó daño por frío en los frutos de gulupa, lo cual se expresó en la alta tasa de pérdida de peso y en la disminución de la vida posrecolección a aproximadamente la mitad del tiempo observado a temperatura ambiental. En tanto, que con el almacenamiento a 8°C, no se generó el efecto de daño por frío, e incluso a esta temperatura se logró prolongar la vida posrecolección en aproximadamente el doble que en condiciones ambientales, y se redujo la tasa de deshidratación. Lo que indica que la temperatura crítica de almacenamiento para los frutos de gulupa, debe encontrarse entre 4°C < crítica < 8°C.

Pero, el efecto de ocasionar daño por frío con el almacenamiento a 4°C, fue aliviado con el uso de atmósferas modificadas. Lo que se evidenció con la reducción de la tasa de pérdida de peso fresco y con el aumento de la vida posrecolección de los frutos a 4°C empacados en Control y Makropol M, respecto a los frutos a 4°C sin empaque. De hecho, en los frutos empacados, con 4°C se superó el tiempo de vida posrecolección de los frutos a temperatura ambiental, logrando tiempos similares a los alcanzados a 8°C. Adicionalmente, con el uso de atmósferas modificadas se observó que la pérdida de peso fresco disminuyó a medida que se redujo la temperatura de almacenamiento.

Con el uso de bajas temperaturas concomitante con el uso de atmósferas modificadas, se evidenció un efecto sinérgico de prolongación de la vida posrecolección y de disminución de la tasa de pérdida fisiológica de peso del fruto. Evidenciando entonces de esta manera, que la atmósfera modificada alivia el efecto severo de marchitamiento presentado a 4°C en los frutos de gulupa, haciendo factible el uso de dicha temperatura con el uso de empaque, idealmente Makropol M.

Respecto a los parámetros bioquímicos y fisicoquímicos, en general, no fueron afectados significativamente por el estado de madurez. Las tendencias de los parámetros bioquímicos fueron en general características del tejido, aunque solo en los azúcares reductores y en la actividad de peroxidasa se vio coincidencia del comportamiento en cáscara y pulpa. Referente a los parámetros fisicoquímicos, se destacó que la refrigeración permitió el cambio de coloración de los frutos, pero fue menor que el logrado a temperatura ambiental.

Se encontró una alta correlación ($r > 0,92$ $p = 0,000$) en la evolución durante el almacenamiento entre azúcares reductores (pulpa y cáscara), fenoles (cáscara), actividad peroxidasa (pulpa y cáscara) y actividad poligalacturonasa (cáscara). También se encontró una alta correlación entre fructosa y glucosa ($r = 0,988$ $p = 0,000$) que se mantuvo durante el transcurso del almacenamiento sin importar las condiciones de temperatura o empaque, manteniendo una relación casi de 1:1. Las correlaciones altas pueden ser interesantes para definir algunos indicadores de seguimiento de los frutos durante el almacenamiento.

Se evidenció un efecto de las bajas temperatura sobre los contenidos de azúcares y las actividades de CAT, POD y PG, siendo destacable la respuesta a 4°C. En los frutos almacenados a 4°C en empaque Control, se encontró que puede haber una alteración en el metabolismo de los azúcares, particularmente de sacarosa. Adicionalmente, en estos mismos frutos, pero únicamente en aquellos con estado de madurez de 50%, hubo cambios de las actividades enzimáticas que sugieren que los frutos de gulupa con el prolongamiento del almacenamiento a esta temperatura, podrían tener una mayor susceptibilidad al daño por frío debida a la depresión de la actividad antioxidante de CAT y al incremento en las actividades de POD y de PG, que propiciarían mayores cambios texturales por la actividad de PG, mayor pardeamiento por la mayor actividad de POD, y en general menor actividad antioxidante que permita lidiar con el daño oxidativo, a lo que se adicionan los bajos niveles de sacarosa, glucosa y fructosa que no parecen permitirle a estos frutos tener un mecanismo de tolerancia al daño por frío. También hay que considerar que este comportamiento particular de los frutos con 50% de madurez pueda deberse a que los frutos de menor estado de madurez pueden ser más sensibles a bajas temperaturas y si estas se encuentran debajo de la crítica, entonces pueden ser más susceptibles a daño por frío.

El efecto de la atmósfera modificada proveída por el empaque Makropol M en general en los parámetros bioquímicos ocasionó una amortiguación del efecto de las bajas temperaturas, disminuyendo el rango de variación o en algunos un cambio en el comportamiento en el tiempo de las actividades enzimáticas. Se destacó que con el empaque Makropol M se redujo el efecto de la baja temperatura sobre las actividades enzimáticas de POD y CAT, encontrándose similares independientemente de la temperatura de almacenamiento, sugiriendo que la atmósfera modificada proveída por el

empaquete puede estar implicada en aliviar los efectos a 4°C, permitiendo la tolerancia a esta temperatura de almacenamiento.

Por lo anterior se sugiere a los azúcares y al comportamiento de las enzimas como principales indicadores del efecto de las bajas temperaturas en la fisiología del fruto de gulupa. Dado que están mostrando en los frutos a 4°C empacados en Control una alta susceptibilidad de sufrir daño por frío, que en el caso de las enzimas se indica solo para los frutos de 50% de madurez.

Por los resultados, se destaca que la pérdida de peso fresco, si bien es un parámetro fisiológico, por su facilidad de medición, podría ser un indicador físico del efecto de las bajas temperaturas en desencadenar daño por frío. Siendo la tasa diaria de pérdida de peso y el rápido marchitamiento o arrugamiento asociado de la cáscara, indicadores de fácil medición y fácilmente observables del efecto de las bajas temperaturas sobre los frutos de gulupa. De manera que para el caso de los frutos almacenados sin empaque, una tasa diaria de pérdida de peso en torno al 0,9% en los frutos a 4°C es un indicio de daño por frío, como también lo es el prematuro marchitamiento de la cáscara respecto a temperatura ambiente.

Entonces si bien el uso del empaque Makropol M confiere prolongación del almacenamiento, es posible que en los frutos refrigerados, debido al largo período de almacenamiento, se alcancen a lograr cambios relacionados con el avance de la maduración producto de las altas actividades de PG, puesto que en general fueron más altas las actividades de esta enzima que en los frutos en empaque Control, y los menores niveles de proteínas.

Sin embargo, es necesario continuar estudios para corroborar esos cambios particulares que se presentaron a 4°C, para confirmar la existencia o no de daño por frío, y las implicaciones sobre la calidad del fruto (organoléptica) y cambios de maduración deseada durante el anaquel.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- La temperatura de almacenamiento para los frutos de gulupa debe ser mayor a 4°C y no superior de 8°C.
- La atmósfera modificada alivió el daño por frío presentado a 4°C, haciendo factible el uso de esta temperatura combinado con la atmósfera modificada, idealmente provista por Makropol M.
- En general, la atmósfera modificada (Makropol M) ocasionó una amortiguación del efecto de las bajas temperaturas en los parámetros bioquímicos, disminuyendo el rango de variación.
- El comportamiento en la evolución de los parámetros fisiológicos, bioquímicos y fisicoquímicos fue muy semejante en frutos con 50% y 75% de madurez.
- Los parámetros bioquímicos no reflejaron totalmente si hubo o no daño por frío.
- Los parámetros fisicoquímicos no fueron indicadores robustos.
- Se sugiere como indicadores bioquímicos a los azúcares y al comportamiento de las actividades enzimáticas de catalasa, peroxidasa y poliglacturonasa; y como indicadores físicos a la tasa diaria de pérdida de peso fresco y al marchitamiento asociado de la cáscara, por ser fácilmente observable y medible.

4.2 Recomendaciones

Dado que no se encontraron diferencias notables entre los estados de madurez del 50% y 75%, se recomienda un estado previo a 75% pero sin llegar a 50% de madurez para evitar que pueda quedar incompleta la maduración. Para esto sería necesario estudiar el comportamiento de frutos con 60-70% de madurez luego del almacenamiento en refrigeración.

Respecto a las condiciones finales de calidad de los frutos de gulupa transcurrido el almacenamiento, se recomienda evaluar en especial los parámetros sensoriales, para establecer si tras el almacenamiento los frutos de los distintos tratamientos en refrigeración alcanzan y mantienen buenas propiedades organolépticas, que sean acordes y adecuadas a los requerimientos del mercado.

Falta también evaluar el comportamiento de estos frutos refrigerados después de ser transferidos a temperatura ambiente, con el fin de establecer si pueden madurar normalmente, o si son incapaces de madurar y para determinar si la calidad en esas condiciones es adecuada para la comercialización. Para esto, se sugiere la realización de análisis sensoriales con panelistas entrenados, para establecer si las bajas temperaturas de almacenamiento pueden afectar negativamente la percepción de calidad del producto, y poder seleccionar según esto los tratamientos que mejor conserven las características sensoriales deseadas para la comercialización del fruto de gulupa.

Para verificar esa susceptibilidad al daño por frío observada en los frutos con madurez de 50% almacenados a 4°C con empaque Control, es necesario realizar un ensayo de maduración complementaria posterior al almacenamiento a 4°C, para verificar si ocurrió daño por frío por la expresión de síntomas asociados a este desorden fisiológico durante la maduración complementaria, como sería la incapacidad de madurar plenamente y de completar el desarrollo de color, la presencia de olores y sabores atípicos, entre otros. Pero adicionalmente, como medición confirmatoria se recomienda evaluar la pérdida de iones durante el almacenamiento a 4°C, que de indicio de la afectación en la funcionalidad de la membrana celular.

Dadas las altas correlaciones encontradas entre las actividades de las enzimas peroxidasa, poligalacturonasa y los contenidos de azúcares reductores y fenoles, al igual que entre los azúcares fructosa y glucosa, se recomienda realizar nuevas investigaciones para explorar si estas relaciones se mantienen en frutos de gulupa de otros orígenes, para poder a futuro modelar estas relaciones y estimar estos parámetros a partir de la medición de sólo una de las variables.

Considerando la prolongación de la vida posrecolección encontrada en los tratamientos evaluados con la presente investigación, se recomienda el uso de bajas temperaturas

conjunto con atmosferas modificados provistas por la película Makropol M para el transporte de larga duración de los frutos de gulupa, como por ejemplo el requerido por vía marítima transcontinental.

Anexo A: Regresiones del porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado

Debido a que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado debidas a los estados de madurez, se presentan a continuación las regresiones lineales obtenidas sin considerar el factor madurez. Las regresiones se realizaron con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$) mediante el programa estadístico Minitab 14; la pendiente obtenida refleja la tasa diaria de pérdida de peso observada en cada uno de los tratamientos.

Empaque	Temperatura	Ecuación	R ²	p-valor
Sin empaque	18°C	$y = 1,560 * \text{días de almacenamiento}$	0,98	0,000
	8°C	$y = 0,352 * \text{días de almacenamiento}$	0,87	0,000
	4°C	$y = 0,916 * \text{días de almacenamiento}$	0,94	0,000
Control	18°C	$y = 0,692 * \text{días de almacenamiento}$	0,97	0,000
	8°C	$y = 0,264 * \text{días de almacenamiento}$	0,96	0,000
	4°C	$y = 0,124 * \text{días de almacenamiento}$	0,97	0,000
Makropol M	18°C	$y = 0,102 * \text{días de almacenamiento}$	0,91	0,000
	8°C	$y = 0,046 * \text{días de almacenamiento}$	0,91	0,000
	4°C	$y = 0,017 * \text{días de almacenamiento}$	0,64	0,000

y: porcentaje de pérdida de peso fresco acumulado en función del tiempo de almacenamiento.

Anexo B: Fotografías de los frutos de gulupa durante el almacenamiento

Frutos con 50% de madurez, almacenados en empaque Control a 4±2, 8±2 y 18±2°C.

		4°C	8°C	18°C
DÍAS DE ALMACENAMIENTO	3			
	6			
	9			
	12			
	15			
	18			

...continúa

Frutos con 75% de madurez, almacenados en empaque Control a 4 ± 2 , 8 ± 2 y $18\pm 2^\circ\text{C}$.

		4°C	8°C	18°C
DÍAS DE ALMACENAMIENTO	3			
	6			
	9			
	12			
	15			
	18			

...continúa

Frutos con 50% de madurez, almacenados en empaque Makropol M a 4 ± 2 , 8 ± 2 y $18\pm 2^\circ\text{C}$.

		4°C	8°C	18°C
DÍAS DE ALMACENAMIENTO	3			
	6			
	9			
	12			
	15			
	18			
	21			
	24			

27			
30			
33			
36			

...continúa

Frutos con 75% de madurez, almacenados en empaque Makropol M a 4 ± 2 , 8 ± 2 y $18\pm 2^\circ\text{C}$.

		4°C	8°C	18°C
DÍAS DE ALMACENAMIENTO	3			
	6			
	9			
	12			
	15			
	18			
	21			
	24			

27				
30				
33				

...continúa

Frutos con 50% y 75% de madurez, almacenados sin empaque a 4 ± 2 , 8 ± 2 y 18 ± 2 °C.

		Madurez	4°C	8°C	18°C
DÍAS DE ALMACENAMIENTO	3	50%			
		75%			
	7	50%			
		75%			
	8	50%			
		75%			
	13	50%			
		75%			

Anexo C: Correlaciones

Las correlaciones entre las variables medidas se realizaron en el programa estadístico Minitab 14, con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$). Se presentan a continuación únicamente las correlaciones significativas, indicando el coeficiente de correlación de Pearson y debajo de éste la significancia de la prueba (p-valor).

	FENC	AZR	AZRC	UPOD	UPODC	FRU
AZR	0,905 0,000					
AZRC	0,981 0,000	0,946 0,000				
UPOD	0,958 0,000	0,928 0,000	0,977 0,000			
UPODC	0,977 0,000	0,94 0,000	0,994 0,000	0,978 0,000		
UPGC	0,966 0,000	0,942 0,000	0,982 0,000	0,978 0,000	0,979 0,000	
GLU						0,988 0,000

FENC: Polifenoles en cáscara; AZR: Azúcares reductores en pulpa; AZRC: Azúcares reductores en cáscara
 UPOD: Actividad peroxidasa en pulpa; UPODC: Actividad peroxidasa en cáscara; UPGC: Actividad poligalacturonasa en cáscara; FRU: Fructosa en pulpa; GLU: Glucosa en pulpa.

Bibliografía

- Abu-Goukh, A.-B.A. & Bashir H.A. 2003. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, 83:213–218.
- Adyanthaya, I. 2007. Antioxidant response mechanism in apples during post-harvest storage and implications for human health benefits. Tesis (Master of Science), University of Massachusetts Amherst, 76p.
- Aebi, H. 1974. Catalase. In: Bergmeyer H.U.(ed). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp 673-684.
- Ali, Z.M., Chin L.H., Marimuthu M. & Lazan H. 2004a. Low temperature storage and modified atmosphere packaging of carambola fruit and their effects on ripening related texture changes, wall modification and chilling injury symptoms *Postharvest Biology and Technology*, 33:181–192.
- Ali, Z.M., Chin L.-H. & Lazan H. 2004b. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*, 167:317-327.
- Alia-Tejacal, I., Colinas-León M.T., Martínez-Damián M.T & Soto-Hernández M.R. 2002. Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) durante poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8(2):263-281.
- Angulo, R. 2010. Gulupa, la fruta de la pasión. Periódico *El Agro Ciencia y Tecnología para el campo*, 11:12-13. Consultado en línea el 20 de Mayo de 2010. Disponible en: http://issuu.com/el_agro/docs/el_agro_edici_n_11?mode=a_p
- Aponte, L. & Guadarrama A. 2003. Actividad de las enzimas pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa durante la maduración de frutos de parchita maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener). *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 29:145-160.
- Arafat, L. 2005. Chilling injury in mangoes. Thesis (Doctor of Philosophy), Wageningen University. Consultado en línea el 20 de Mayo de 2010. Disponible en

<http://www.docstoc.com/docs/3851695/Chilling-injury-in-mangoes-Loay-Abd-Ellatif-Taha-Arafat-Promotor>

- Arjona, H.E. 1990. Postharvest physiology studies of passion fruit (*Passiflora edulis*, Sims). Thesis (Doctor of Philosophy), Mississippi State University, Mississippi, 99p.
- Arjona, H.E. & Matta F.B. 1991. Postharvest quality of passion fruit as influenced by harvest time and ethylene treatment. *HortScience*, 26(10):1297-1298.
- Arjona, H.E., Matta F.B. & Garner J.O. 1992. Temperature and storage time affect quality of yellow passion fruit. *HortScience*, 27(7):809-810.
- Aular, J., Ruggiero C. & Durigan J. 2001. Efecto de la envoltura plástica y el tiempo de almacenamiento sobre el comportamiento poscosecha de frutos de parchita maracuyá. *Bioagro*, 13(1):15-21.
- Awad, M.A., Al-Qurashi A.D. & Mohamed S.A. 2011. Antioxidant capacity, antioxidant compounds and antioxidant enzyme activities in five date cultivars during development and ripening. *Scientia Horticulturae*, 129:688-693.
- Baquero-Duarte, L.E., Castro-Rivera J.A. & Narváez-Cuenca C.E. 2005. Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. *Acta Biológica Colombiana*, 10(2):49-59.
- Barboni, T., Cannac M & Chiaramonti N. 2010. Effect of cold storage and ozone treatment on physicochemical parameters, soluble sugars and organic acids in *Actinidia deliciosa*. *Food Chemistry*, 121:946-951.
- Bashir, H.A & Abu-Goukh A.-B.A. 2003. Compositional Changes during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, 80:557-563.
- Ben-Yehoshua, S. & Rodov, V. 2003. Transpiration and water stress. En Bartz J.A. & Brecht J.K. (eds.) *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. Marcel Dekker, New York, pp 111–159.
- Bouzayen, M., Latché A., Nath P. & Pech J. C. 2010. Mechanism of Fruit Ripening En: Pua E.C. & Davey M.R. (Eds). *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. Springer Berlin Heidelberg, pp 319-339.
- Bradford, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248-256.

- Bravo, L. 1998. Phenolic phytochemicals: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11):317-333.
- Brummell, D.A. & Harpster M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47(1-2):311-340.
- Brummell, D.A, Cin V.D., Crisosto C.H. & Labavitch J.M. 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55(405):2029-2039.
- Cao, S., Yang Z. & Zheng Y. 2013. Sugar metabolism in relation to chilling tolerance of loquat fruit. *Food Chemistry*, 136(1):139-143.
- Carvajal, F., Martínez C., Jamilena M. & Garrido D. 2011. Differential response of zucchini varieties to low storage temperature. *Scientia Horticulturae*, 130:90-96.
- Castellanos-Espinosa, D.A. 2010. Caracterización de algunos parámetros bioquímicos de maduración de gulupa en atmosferas modificadas. Tesis (Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 59p.
- Castro-Cruz, E.M. 2009. Determinación de índices de recolección de gulupa, caracterización de la calidad nacional del producto. Tesis (Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 30p.
- Ceci, L., & Lozano J. 1998. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. *Food Chemistry*, 61(1/2):237-241.
- Chassagne, D., Crouzet J., Bayonove C.L., Brillout J.N. & Baumes R.L. 1997. Glycosidically bound eugenol and methyl salicylate in the fruit of edible *Passiflora* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45:2685-2689.
- Chassagne, D., Boulanger R. & Crouzet J. 1999. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. *Food Chemistry*, 66:281-288.
- Chinnici, F. Spinabelli U., Riponi C. & Amati A. 2005. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(2-3):121-130.
- Cordenunsi, B.R, Genovese M.I., Oliveira Do Nascimento J.R., Aymoto-Hassimotto N.M, Dos Santos R.J. & Lajolo F.M. 2005. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, 91:113-121.

- Dalisay, R.F. & Kúc J.A. 1995. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47(5):315-327.
- Dantas de Moraes, P.L., de Oliveira Lima L.C., Alcântara de Miranda M.R., Donizete Alves J., Alves R.E. & Silva J.D. 2008. Enzyme activities and pectin breakdown of sapodilla submitted to 1-methylcyclopropene. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 43(1):15-20.
- Der Agopian, R.G., Goncalves Peroni-Okita F.H., Aparecida Soares C., Aparecida Mainardi J., Oliveira do Nascimento J.R., Cordenunsi B.R., Lajolo F.M. & Purgatto E. 2011. Low temperature induced changes in activity and protein levels of the enzymes associated to conversion of starch to sucrose in banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 62(2):133-140.
- Díaz, R.O., Moreno L., Pinilla R., Carrillo W., Melgarejo L.M., Martínez O., Hernández M.S. & Fernández-Trujillo J.P. 2012. Postharvest behavior of purple passion fruit in Xtend® bags during low temperature storage. *Acta Horticulturae*, 934:727-732.
- Espinoza, A., Arreaza R., Cardona E., Mendez J., Cañizares A. & Buonafina O. 2008. Efecto del empaque, temperatura y tiempo de almacenamiento sobre características físicas de frutos de parchita (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa* Degener). *Revista tecnológica ESPOL*, 21(1):55-63.
- Flórez, L.M. 2012. Caracterización fisiológica y bioquímica del fruto de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) bajo tres ambientes contrastantes. Tesis (Maestría en Ciencias Agrarias), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 131p.
- Flórez, L.M., Pérez L.V., Melgarejo L.M. & Hernández S. 2012. Caracterización fisicoquímica, fisiológica y bioquímica del fruto de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) como indicadores para el punto óptimo de cosecha. En: Melgarejo L.M (ed). *Ecofisiología del cultivo de la gulupa (Passiflora edulis Sims)*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 144p.
- Frenkel, C., Klein I. & Dilley D.R. 1968. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. *Plant Physiology*, 43:1146-1153.
- Gallander, J. 1985. *The science workbook: student research projects in food-agriculture-natural resources*. Ohio State University, Ohio, 119p.
- Getinet, H., Workneh T.S. & Woldetsadik K. 2011. Effect of maturity stages, variety and storage environment on sugar content of tomato stored in multiple pads evaporative cooler. *African Journal of Biotechnology*, 10(80):18481-18492.

- Girardi, C.L., Corrent A.R., Lucchetta L., Zanuzo M.R., da Costa T.S., Brackmann A., Twyman R.M., Nora F.R., Nora L., Silva J.A. & Rombaldi C.V. 2005. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripa) during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.*, 38: 25-33. *Postharvest Biology and Technology*, 38(1):25-33.
- Gómez, K. 2000. Efecto de la temperatura de almacenamiento y uso de cera sobre la actividad respiratoria y algunos atributos de calidad de frutos de parchita *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener cv "Maracuya". *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*, 17(1):1-9.
- Goulao, L.F. & Oliveira C.M. 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 19:4-25.
- Graham, D. & Patterson, B. D. 1982 Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism and accumulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 33:347-372.
- Gualanduzzi, S., Baraldi E., Braschi I., Carnevali F., Gessab C.E. & De Santis A. 2009. Respiration, hydrogen peroxide levels and antioxidant enzyme activities during cold storage of zucchini squash fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 52:16-23.
- Gutiérrez, L.A. 2010. Desarrollo de un empaque polimérico con propiedades anti-empañantes apropiado para la comercialización de gulupa (*Passiflora edulis* Sims fo. *edulis*). Tesis (Maestría en Ciencias Química), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Hadfield, K.A. & Bennet A.B. 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*, 117:337-343.
- Hernández, A. & Bernal R. 2000. Lista de Especies de Passifloraceae de Colombia. *Biota Colombiana*, 1(3):320-335.
- Hernández, M.S., Martínez O. & Fernández-Trujillo J.P. 2007. Behavior of araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening. *Scientia Horticulturae*, 111(3):220-227.
- Hernández, M.S. & Fischer G. 2009. Cosecha y poscosecha en las frutas pasifloráceas. En: Miranda, D., Fischer G., Carranza C., Magnitskiy S., Casierra-Posada F., Piedrahíta W. & Flórez L.E. (eds.) *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba*. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá.

- Imahori, Y., Takemura M. & Bai J. 2008. Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1):54-60.
- Javanmardi, J. & Kubota C. 2006. Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2):151-155.
- Jiménez, A., Gómez J.M., Navarro E. & Sevilla F. 2002. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8):515-520.
- Jiménez, A.M., Sierra C.A., Rodríguez-Pulido F.J., González-Miret M.L., Heredia F.J. & Osorio C. 2011. Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. f. *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, 44(7):1912-1918.
- Kader, A.A. 1992. *Postharvest technology of horticultural crops*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3311. Oakland, California, 296p.
- Kader, A.A. & Watkins C.B. 2000. Modified atmosphere packaging-toward 2000 and beyond. *HortTechnology*, 10(3):483-486.
- Kireyko, A.V., Veselova I.A. & Shekhovtsova T.N. 2006. Mechanisms of peroxidase oxidation of o-dianisidine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, and o-phenylenediamine in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 32(1):71-79.
- Kishore, K., Pathak K., Shukla R. & Bharali R. 2011. Effect of storage temperature on physico-chemical and sensory attributes of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Journal of Food Science and Technology*, 48(4):484-488.
- Knekt, P., Kumpulainen J., Järvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A., Hakulinen T. & Aromaa A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3):560-568.
- Kouakou-Dje, M., Dabonne S., Tagro-Guehi S. & Patrice-Kouame L. 2010. Monitoring of some biochemical parameters of two yam species (*Dioscorea spp*) tubers parts during post-harvest storage. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(3):178-183.

- Lamikanra, O. & Watson M.A. 2001. Effects of ascorbic acid on peroxidase and polyphenoloxidase activities in fresh-cut cantaloupe melon. *JFS: Food Chemistry and Toxicology*, 66(9):1283-1286.
- Lee, S.K. & Kader A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20:207-220.
- Lelièvre, J.M., Latche A., Jones B., Bouzayen M. & Pech J.C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 101:727-739.
- Lim, C.S., Kang S.M., Cho J-L. & Gross, K.C. 2009. Antioxidizing enzyme activities in chilling-sensitive and chilling-tolerant pepper fruit as affected by stage of ripeness and storage temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1):156-163.
- Lounds-Singleton, A.J. 2003. Influence of thermal postharvest stress on mango (*Magnifera indica*) polyphenolics during ripening. Thesis (Master of Science), University of Florida, Florida, 57p.
- Marangoni, A.G., Palma T. & Stanley D.W. 1996. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology*, 7:193-217.
- Martínez, G.A. Civello P.M. Chaves A.R. & Añón M.C. 2001. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry*, 58:379-387.
- Martínez, S.M. 2010. Desarrollo de un empaque polimérico activo que prolonga la vida útil de la gulupa (*Pasiflora edulis* Sims fo. *edulis*) en anaquel. Tesis (Magister en Ciencias Química), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 61p.
- Menéndez-Aguirre, O., Evangelista-Lozano S., Arenas-Ocampo M., Bermúdez-Torres K., Martínez A. & Jiménez-Aparicio A. 2006. Cambios en la actividad de α -amilasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa durante la maduración del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* degener). *Interciencia*, 31(10):728-733.
- Miranda, M.R.A., Silva F.S., Filgueiras H.A.C., Alves R.E. & Araújo N.C.C. 2002. Enzymes and pectin breakdown of saposilla during modified atmosphere storage. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, 45:18-21.
- Moing, A., Renaud C., Gaudillère M., Raymond P., Roudeillac P. & Denoyes-Rothan B. 2001. Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126:394-403.

- Moreno, L., Crespo S., Pérez W. & Melgarejo L.M. 2010. Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. En: Melgarejo L.M. (ed). Experimentos en fisiología y bioquímica vegetal. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 260p.
- Mota, W.F. da, Salomão L.C., Cecon P.R. & Finger F.L. 2003. Waxes and plastic film in relation to the shelf life of yellow passion fruit. *Scientia Agricola*, 60(1):51-57.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 153:257-262.
- Ocampo, J., d'Eeckenbrugge G.C., Restrepo M., Jarvis A., Salazar M. & Caetano C. 2007. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana*, 8(1):1-45.
- Oms-Oliu, G., Hertog M.L.A.T.M., Van de Poel B., Ampofo-Asiama J., Geeraerd A.H. & Nicolaï B.M. 2011. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 62:7-16.
- Orjuela-Baquero, N.M., Campos-Alba S., Sánchez-Nieves J., Melgarejo L.M. & Hernández M.S. 2011. Manual de manejo poscosecha de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims). En: Melgarejo L.M. & Hernández M.S. (eds) Poscosecha de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 58p.
- Ortega, N., de Diego S., Perez-Mateos M. & Busto M.D. 2004. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 88:209-217.
- Pareek, S., Yahia Elhadi M., Pareek O.P. & Kaushik R.A. 2011. Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International*, 44(7):1741-1751.
- Payasi A. & Sanwal G.G. 2010. Ripening of climacteric fruits and their control. *Journal of Food Biochemistry*, 34:679-710.
- Pérez-Tello, G.O., Silva-Espinoza B.A., Vargas-Arispuro I., Briceno-Torres B.O. & Martínez-Tellez M.A. 2001. Effect of temperature on enzymatic and physiological factors related to chilling injury in carambola fruit (*Averrhoa carambola* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287:846-851.
- Pérez-Tello, G.O., Martínez-Téllez M.A., Vargas-Arispuro I. & González-Aguilar G.A. 2009. Chilling injury in mamey sapote fruit (*Pouteria sapota*): biochemical and physiological responses. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(2):137-145.

- Pesis, E., Aharoni D., Aharon Z., Ben-Arie R., Aharoni N. & Fuchs Y. 2000. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 19(1):93-101.
- Piljac-Žegarac, J. & Šamec D. 2011. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Research International*, 44:345-350.
- Pinzón, I., Fisher G. & Corredor G. 2007. Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims). *Agronomía Colombiana*, 25(1):83-95.
- Protsenko, M.A., Bulantseva E.A. & Korableva N.P. 2010. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant fleshy fruits during their ripening and infections. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(3):356-362.
- Pruthi, J. 1963. Physiology, chemistry and technology of passion fruit. *Advances in Food Research*, 12:203-282.
- Purvis, A.C. 2002. Diphenylamine reduces chilling injury of green bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25:41–48.
- Quesada, P. & Matta F.B. 1992. Cold hardiness of *Passiflora* species. *HortScience*, 27(11):1167.
- Rapisarda, P., Lo-Bianco M., Pannuzzo P. & Timpanaro N. 2008. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Postharvest Biology and Technology*, 49:348-354.
- Robards, K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. & Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.
- Rugkong, A., Rose J., Lee S.J., James J., O'Neill M.A. & Watkins C.B. 2010. Cell wall metabolism in cold-stored tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 57(2):106-113.
- Sáenz, M.V., Castro-Barquero L. & González-Calvo J. 1991. Efecto del empaque y la temperatura de almacenamiento sobre la vida poscosecha y la calidad de los frutos de maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). *Agronomía Costarricense*, 15(1/2):79-83.
- Sakai, T., Sakamoto T., Hallaert J. & Vandamme E.J. 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39:213-294.

- Sánchez-Bel, P., Egea I., Sánchez-Ballesta M.T., Martínez-Madrid C., Fernandez-Garcia N., Romojaro F., Olmos E., Estrella E., Bolarín M.C. & Flores F.B. 2012. Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach. *Journal of Proteomics*, 75:5463-5478.
- Sandhya. 2010. Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3):381-392.
- Sevillano, L., Sanchez-Ballesta M.T., Romojaro F. & Flores F.B. 2009. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4):555-573.
- Shen, Z., Reese J.C. & Reeck G.R. 1996. Purification and characterization of polygalacturonase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(5):427-433.
- Shewfelt, R.L. & Prussia S.E. 1993. Postharvest handling: a systems approach. Academic Press, San Diego, 358p.
- Shin, Y., Liu R.H., Nock J.F., Holliday D. & Watkins C.B. 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45(3):349-357.
- Shiomi, S., Kubo Y., Wamochob L.S., Koazec H., Nakamura R. & Inaba A. 1996a. Postharvest ripening and ethylene biosynthesis in purple passion fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 8(3):199-207.
- Shiomi, S., Wamocho L.S & Agong S.G. 1996b. Ripening characteristics of purple passion fruit on and off the vine. *Postharvest Biology and Technology*, 7(1-2):161-170.
- Sivakumar, D., Yuming J. & Yahia E.M. 2011. Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. *Food Research International*, 44(5):1254-1263.
- Škerget, M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A.R., Simonič M. & Knez Ž. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89:191-198.
- Somboonkaew, N. & Terry L.A. 2010. Altered physiology and biochemistry of imported litchi fruit held under different vapor pressure deficits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10):6209-6218.

- Somogyi, M. 1952. Notes of sugar determination. The Journal of Biological Chemistry, 195:19-23.
- Srilaong, V. & Tatsumi Y. 2003. Changes in respiratory and antioxidative parameters in cucumber fruit (*Cucumis sativus* L.) stored under high and low oxygen concentrations. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 72(6):525-532.
- Supapvanich, S., Pimsaga J. & Srisujan P. 2011. Physicochemical changes in fresh-cut wax apple (*Syzygium samarangense* [Blume] Merrill & L.M. Perry) during storage. Food Chemistry, 127:912-917.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients, 2:1231-1246.
- Valente, A., Gonçalves-Albuquerque T., Sanches-Silva A. & Costa H.S. 2011. Ascorbic acid content in exotic fruits: a contribution to produce quality data for food composition databases. Food Research International, 44:2237-2242.
- Wang, C.Y. & Qi L. 1997. Modified atmosphere packaging alleviates chilling injury in cucumbers Postharvest Biology and Technology, 10:195-200.
- Wills, R., McGlasson B., Graham G. & Joyce D. 1998. Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. Segunda edición. Acribia S.A., Zaragoza, España, 240p.
- Zor, T. & Sellinger Z. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Analytical biochemistry, 236:302-308.