

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN PRE-COSECHA DE ÁCIDO  
SALICÍLICO, ACETIL SALICÍLICO Y SALICILATO DE METILO  
EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE CEREZAS EN LA  
RECOLECCIÓN Y DURANTE EL ALMACENAMIENTO  
POST-RECOLECCIÓN**

---



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

Escuela Politécnica Superior de Orihuela

Departamento de Tecnología Agroalimentaria

**Tesis Doctoral**

María José Giménez Torres

2015

---



**EFFECTO DE LA APLICACIÓN PRE-COSECHA DE ÁCIDO  
SALICÍLICO, ACETIL SALICÍLICO Y SALICILATO DE METILO  
EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE CEREZAS EN LA  
RECOLECCIÓN Y DURANTE EL ALMACENAMIENTO  
POST-RECOLECCIÓN**

---



**Tesis presentada por:**

María José Giménez Torres

**Directores:**

Dr. Juan Miguel Valverde Veracruz

Dr. Daniel Valero Garrido





**Efecto de la aplicación pre-cosecha de ácido salicílico, acetil salicílico y salicilato de metilo en los parámetros de calidad de cerezas en la recolección y durante el almacenamiento post-recolección**

Tesis doctoral realizada por María José Giménez Torres, Licenciada en Biología en la Universidad de Alicante y Máster Universitario en Investigación en Ciencia, Tecnología y Control de los Alimentos, en el Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para la obtención del grado de Doctor.

Fdo.: María José Giménez Torres

Orihuela, de de 2015





**Dr. José Ramón Díaz Sánchez**, Dr. Ingeniero Agrónomo, Catedrático de Escuela Universitaria y Director del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández,

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada **‘Efecto de la aplicación pre-cosecha de ácido salicílico, acetil salicílico y salicilato de metilo en los parámetros de calidad de cerezas en la recolección y durante el almacenamiento post-recolección’** de la que es autora la Licenciada en Biología y Máster en Investigación en Ciencia, Tecnología y Control de los Alimentos **María José Giménez Torres** ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Juan Miguel Valverde Veracruz**, profesor asociado y el **Dr. Daniel Valero Garrido**, Catedrático de Universidad, ambos adscritos al Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche, la considero conforme en cuanto a forma y contenido para que sea presentada para su correspondiente exposición pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a doce de Noviembre de dos mil quince.

Fdo.: Dr. José Ramón Díaz Sánchez







**Dr. Juan Miguel Valverde Veracruz**, Profesor Asociado y **Dr. Daniel Valero Garrido**, Catedrático de Universidad adscritos al Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández,

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral Titulada **`Efecto de la aplicación pre-cosecha de ácido salicílico, acetil salicílico y salicilato de metilo en los parámetros de calidad de cerezas en la recolección y durante el almacenamiento post-recolección'** de la que es autora la Licenciada en Biología y Máster en Investigación en Ciencia, Tecnología y Control de los Alimentos **María José Giménez Torres** ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos a que sea presentada para optar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente certificado en Orihuela a doce de noviembre de dos mil quince.

Fdo.: Dr. Juan Miguel Valverde Veracruz

Fdo.: Dr. Daniel Valero Garrido



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Juan Miguel Valverde y el Dr. Daniel Valero, por haber confiado en mí y brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis en el grupo de Post-Recolección de la UMH, por su esfuerzo y dedicación.

Agradecer también a la Dra. María Serrano por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua del trabajo realizado. Al Dr. Pedro J. Zapata por la motivación, el apoyo recibido y por su amistad a lo largo de estos años. A los Dres. Fabián Guillén, Domingo Martínez y Salvador Castillo, por su participación en este Proyecto y por la ayuda que me han ofrecido durante este tiempo. A la Dra. Huertas M<sup>a</sup> Díaz por sus consejos y ayuda en mis inicios en el laboratorio.

Muchas gracias a todo el grupo de Post-Recolección. Ha sido un auténtico placer conocerlos y compartir estos años con vosotros a nivel profesional y personal.

A los Doctorandos Diego Paladines y Alejandra Martínez por compartir juntos esta experiencia, por todos los momentos vividos en los que, además de trabajo y esfuerzo, no han faltado confidencias, risas y muy buenos momentos. Alejandra, trabajar en el mismo Proyecto nos ha hecho compartir muchas horas y me has hecho muy grato el trabajo debido a nuestra complicidad y buen entendimiento. Gracias por toda la ayuda y apoyo que me habéis dado. Espero que nuestra amistad dure para siempre.

A los alumnos que han pasado por el laboratorio para realizar sus TFG, con los que trabajé en algún momento, María Emma, Nerea, Jessica, Marta, Marina y David.

Agradecer a mi familia por estar siempre a mi lado y confiar en mí. Un agradecimiento muy especial a mi marido por su apoyo incondicional y disposición en este y otros propósitos, por su comprensión, paciencia y ánimo. Y a mi hija Paula, el mejor regalo y la mayor ilusión de mi vida, junto con la pequeña que crece en mi interior y me acompaña en esta última etapa de la Tesis.



## RESUMEN

Las cerezas (*Prunus avium* L.) son muy apreciadas por los consumidores de todo el mundo, por su excelente apariencia, precocidad y por sus atributos de calidad organoléptica así como por su contenido en compuestos bioactivos con actividad antioxidante. En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes estrategias pre-cosecha para incrementar los atributos de calidad de cerezas en el momento de la recolección. Los salicilatos son compuestos naturales de las plantas y han mostrado mejorar la calidad de los frutos cuando se utilizan como tratamientos post-cosecha.

En esta Tesis se evaluó el efecto de los tratamientos pre-cosecha de cerezas con ácido salicílico (AS), ácido acetil salicílico (AAS) y salicilato de metilo (SaMe), sobre los parámetros relacionados con la calidad organoléptica (tamaño, color, firmeza y propiedades sensoriales), nutritiva (contenido en sólidos solubles totales, SST y acidez total, AT) y funcional (compuestos bioactivos como antocianinas, fenoles y carotenoides y actividad antioxidante hidrosoluble (AAT-H) y liposoluble (AAT-L) de las cerezas, tanto durante su desarrollo en el árbol como durante el almacenamiento refrigerado. Además, también se estudió el efecto de estos tratamientos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), peroxidasa (POX), superóxido dismutasa (SOD), y ascorbato peroxidasa (APX), por su relación con los procesos de sobre-maduración y senescencia. Los experimentos se realizaron durante dos años consecutivos usando dos variedades, 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' en 2013, y tres variedades, 'Sweet Heart', 'Sweet Late' y 'Lapins' en 2014. Además, en el año 2015 se realizó un experimento de tratamientos post-recolección con SaMe en la variedad 'Early Lory'.

En los experimentos de 2013, se aplicaron los tres tratamientos a tres concentraciones (0,5, 1 y 2 mM) en tres puntos clave del desarrollo del fruto: endurecimiento del hueso, inicio de los cambios de color e inicio de la maduración. Los resultados mostraron que la concentración más adecuada de AAS y de SaMe fue 1 mM, mientras que para AS fue 0,5 mM, en términos de incrementar algunos

parámetros de calidad, tales como peso del fruto, color, firmeza, SST y AT, contenido en compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes de las cerezas en el momento de la recolección. Sin embargo, los tratamientos no afectaron al proceso de maduración de las cerezas en el árbol y todas ellas, tanto las de árboles control como las de árboles tratados se recolectaron en la misma fecha, de acuerdo con su estado de maduración comercial, según su color externo y contenido en SST.

En 2014 se realizaron nuevos experimentos en los que se aplicó la mejor concentración de cada uno de los compuestos y se evaluó la calidad de los frutos durante el desarrollo en el árbol y en el momento de la recolección, confirmando los resultados del año anterior. Además, estos frutos se almacenaron en refrigeración, para comprobar el efecto de los tratamientos sobre la evolución de sus atributos de calidad. Los frutos tratados con AS 0,5 mM y AAS 1 mM tuvieron mayor color, firmeza, SST, fenoles totales, antocianinas totales y AAT-H en las tres variedades en el momento de la recolección y durante el almacenamiento. Además, también la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, POX, SOD, y APX en el momento de la recolección fue mayor en las cerezas tratadas con AS y AAS que en las control. La actividad de estas enzimas antioxidantes disminuyó durante la conservación, pero este descenso fue significativamente retrasado en las cerezas tratadas con SA y ASA.

En el caso del tratamiento pre-cosecha con SaMe 1 mM se evaluó su efecto sobre las propiedades organolépticas, contenido de compuestos antioxidantes y enzimas antioxidantes durante el almacenamiento refrigerado en los experimentos de los años 2013 y 2014. Todos los resultados mostraron que los tratamientos pre-cosecha de cerezos con SaMe dieron lugar a frutos con mayor contenido en compuestos antioxidantes, tales como fenoles y antocianinas totales, en el momento de la recolección y durante el almacenamiento. Además, también se produjo un aumento en las enzimas antioxidantes estudiadas, inducido por los tratamientos con SaMe.

En general se observó un efecto de los tratamientos con AS, AAS y SaMe ralentizando el proceso de maduración post-cosecha de las cerezas, ya que se retrasó la evolución del color, las pérdidas de peso, firmeza y acidez y manteniendo mayores

niveles en la concentración de compuestos bioactivos y de actividad antioxidante, así como de las enzimas antioxidantes. Por tanto, los tratamientos de los cerezos con AS, AAS y SaMe, podrían ser herramientas pre-cosecha prometedoras para mejorar la calidad de las cerezas en la recolección y retrasar sus pérdidas durante el almacenamiento.

Además, se realizó un experimento en post-cosecha donde se estudió el efecto de tratamientos con salicilato de metilo (SaMe) a dos concentraciones (0,1 y 1 mM) en cerezas 'Early Lory' sobre los atributos de calidad, los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante. Los tratamientos con SaMe fueron efectivos reduciendo la tasa de respiración, la pérdida de peso, ablandamiento, y pérdida de acidez total y aumentando el índice de madurez durante 20 días de almacenamiento a 2°C, en comparación con los frutos control no tratados. Además, los fenoles totales, las antocianinas totales y la AAT-H se mantuvieron a mayores concentraciones al final del periodo de almacenamiento en los frutos tratados.

Por tanto, los tratamientos con salicilatos, como componentes naturales de las plantas, podrían ser considerados como herramientas, seguras y respetuosas con el medio ambiente para ser aplicados en pre-cosecha o en post-cosecha para mejorar los atributos de calidad de los frutos en el momento de la recolección y durante el almacenamiento, así como para mejorar los beneficios que aportan a la salud el consumo de cerezas.

Estos resultados se han publicado en Food Chemistry (Giménez et al., 2014), Scientia Horticulturae (Giménez et al., 2015) y Postharvest Biology and Technology (Valverde et al., 2015).





## ABSTRACT

Cherries (*Prunus avium* L.) are highly appreciated fruit by consumers around the world for their good appearance, precocity, their organoleptic attributes as well as their content of bioactive compounds with antioxidant activity. In recent years, several pre-harvest strategies have been conducted to increase the quality attributes of cherries at time of harvest. Salicylates are natural compounds from plants and have been shown to improve fruit quality when used as post-harvest treatments.

In this PhD Thesis the effect of pre-harvest treatments to cherry trees with salicylic acid (SA), acetylsalicylic acid (ASA) and methyl salicylate (MeSA) on the parameters related to the organoleptic quality (size, color, firmness and sensory properties), nutritious (total soluble solids, TSS and total acidity, TA) and functional (bioactive compounds such as anthocyanins, phenolics, carotenoids and hydrophilic (H-TAA) and lipophilic (L-TAA) antioxidant activity) were evaluated, both during development on-tree and during refrigerated storage. Furthermore, the effect of these treatments on the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) was also studied, due to their relationship with the over-ripening and senescence processes. The experiments were conducted during two consecutive years using two varieties, 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' in 2013, and three varieties 'Sweet Heart' 'Sweet Late' and 'Lapins' in 2014. Also, in 2015 an experiment with post-harvest treatments with MeSA in the variety 'Early Lory' was performed.

In the experiments of 2013, the three treatments at three concentrations (0.5, 1 and 2 mM) were applied at three key points of fruit development: pit hardening, beginning of color changes and onset of ripening. The results showed that the best concentration for ASA and MeSA was 1 mM, while for SA was 0.5 mM, in terms of increasing quality parameters, such as fruit weight, color, firmness, TSS and TA, content of bioactive compounds and antioxidant properties of cherries at time of harvesting. However, the treatments did not affect the on-tree ripening process, and

all cherries (both control and treated trees) were picked the same date, according to their commercial ripening stage based on external color and TSS.

In 2014, new experiments with the best concentration of each compound was applied and the fruit quality was evaluated during development on-tree and at time of harvest, confirming the obtained results from the previous year. Moreover, these fruits were stored in refrigeration to assay the effect of treatments on the evolution of their quality attributes. The treated fruit with SA at 0.5 mM and ASA at 1 mM had more color index, firmness, TSS, total phenolics, total anthocyanins and H-TAA in the three cultivars at time of harvest and during storage. Furthermore, also the activity of antioxidant enzymes CAT, POX, SOD and APX at harvest were greater in cherries treated with SA and ASA than in control fruit. The activity of these antioxidant enzymes decreased during storage, but this decline was significantly delayed in cherries treated with SA and ASA.

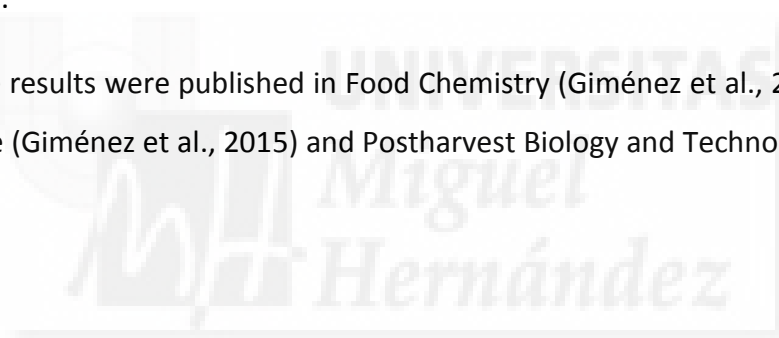
In the case of pre-harvest treatment with 1 mM MeSA, the effect on the organoleptic properties, antioxidants and antioxidant enzymes compounds were evaluated during refrigerated storage in the experiments of 2013 and 2014. All results showed that pre-harvest treatments to sweet cherry trees with MeSA resulted in fruit with higher content of antioxidants compounds such as phenols and total anthocyanins, at time of harvest and during storage. In addition, there was also an increase in the studied antioxidant enzymes induced by MeSA treatments.

Overall, significant effects of the treatments with SA, ASA and MeSA on delaying the postharvest ripening process of sweet cherries were observed, since color changes, weight loss, softening and acidity losses were retarded while maintained higher levels in the concentration of bioactive compounds, antioxidant activity as well as the activity of the antioxidant enzymes. Therefore, pre-harvest treatments to cherry trees with SA, ASA and MeSA could be promising tools for improving the quality of cherries at harvest and delaying the normal post-harvest losses that normally occur during storage.

In addition, an experiment with 'Early Lory' cultivar by applying post-harvest treatments with MeSA at two concentrations (0.1 and 1 mM) and evaluating their effects on quality attributes, bioactive compounds and antioxidant activity was carried out. MeSA treatments were effective in reducing respiration rate, weight loss, softening, and loss of total acidity and the normal increase of maturity index (TSS/TA) for 20 days of storage at 2 °C, compared with untreated control fruits. In addition, total phenols, total anthocyanins and H-TAA remained at higher concentrations at the end of the storage period in the treated fruit.

Therefore, treatments with the natural occurring salicylates from plant origin could be considered as safe tools and environmentally friendly to be applied either at pre-harvest or post-harvest for improving the quality attributes of cherry fruit at time of harvest and during storage, and to enhance the health-benefits related to the sweet cherry intake.

These results were published in Food Chemistry (Giménez et al., 2014), Scientia Horticulturae (Giménez et al., 2015) and Postharvest Biology and Technology (Valverde et al., 2015).





<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1. VARIEDADES DE CEREZAS</b>	<b>3</b>
<b>1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA</b>	<b>5</b>
<b>1.3. EL FRUTO: CRECIMIENTO Y MADURACIÓN</b>	<b>8</b>
1.3.1. Crecimiento del fruto	8
1.3.2. Maduración del fruto	11
1.3.3. Cambios de color	12
1.3.4. Composición de ácidos y azúcares	16
1.3.5. Cambios en la firmeza	19
1.3.6. Aromas	21
1.3.7. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante	22
1.3.8. Fisiología de la maduración	27
<b>1.4. CALIDAD DEL FRUTO EN LA RECOLECCIÓN Y CAMBIOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO</b>	<b>30</b>
1.4.1. Concepto de calidad	31
1.4.2. Pérdida de peso	32
1.4.3. Color	34
1.4.4. Firmeza	35
1.4.5. Flavor, sabor y aroma	36
1.4.6. Compuestos bioactivos	38
1.4.7. Podredumbres	39
<b>1.5. TRATAMIENTOS POST-COSECHA PARA MANTENER LA CALIDAD DEL FRUTO</b>	<b>40</b>
1.5.1. Conservación a baja temperatura	41
1.5.2. Tratamientos térmicos	42
1.5.3. Tratamientos con calcio	43
1.5.4. Poliaminas	46
1.5.5. 1-Metil ciclopropeno	48
1.5.6. Envasado en atmósfera modificada	50
1.5.7. Recubrimientos comestibles	53

<b>1.6. DERIVADOS DE SALICILATOS: ÁCIDO SALICÍLICO, ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO Y SALICILATO DE METILO</b>	56
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b>	65
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	69
<b>3.1. MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	69
<b>3.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS</b>	72
3.2.1. Tasa de respiración	72
3.2.2. Pérdida de peso	73
3.2.3. Color	73
3.2.4. Textura	73
3.2.5. Homogeneización de muestras	74
3.2.6. Sólidos solubles totales	74
3.2.7. Acidez titulable	74
3.2.8. Fenoles totales	74
3.2.9. Antocianinas	75
3.2.10. Actividad antioxidante total	76
3.2.11. Carotenoides	77
3.2.12. Enzimas antioxidantes	77
3.2.13. Proteínas	79
3.2.14. Análisis sensorial	79
3.2.15. Análisis estadístico	79
<b>CAPÍTULO 4. ARTÍCULOS PUBLICADOS</b>	83
<b>Publicación 1</b>	83
Tratamientos de cerezos con salicilato de metilo mejoran la calidad de las cerezas en la recolección y durante el almacenamiento	
<b>Publicación 2</b>	109
Tratamientos de cerezos con salicilato de metilo incrementan los sistemas antioxidantes de los frutos en la cosecha y durante el almacenamiento	

<b>Publicación 3</b>	133
Efecto de tratamiento pre-cosecha con ácido salicílico y ácido acetil salicílico sobre la calidad y propiedades antioxidantes en cerezas	
<b>CAPÍTULO 5. ARTÍCULOS ENVIADOS</b>	157
<b>Artículo 1</b>	157
Tratamiento pre-cosecha con ácido salicílico y ácido acetil salicílico mantienen la calidad y aumentan los sistemas antioxidantes durante el almacenamiento post-cosecha de cerezas	
<b>Artículo 2</b>	183
Tratamientos post-cosecha con salicilato de metilo retrasan el proceso de maduración y mantienen los atributos de calidad y los compuestos antioxidantes de cerezas 'Early Lory'	
<b>CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN</b>	207
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES</b>	217
<b>CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA</b>	221
<b>ANEXOS</b>	253





# Capítulo 1. Introducción

---





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. VARIEDADES DE CEREZAS

Las principales especies de cerezo cultivadas en el mundo son el cerezo dulce (*Prunus avium*), el guindo (*P. cerasus*) y el cerezo "Duke", híbrido de los anteriores. Ambas especies son naturales del sureste de Europa y oeste de Asia. El cerezo dulce tuvo su origen probablemente en el mar Negro y en el mar Caspio, difundándose después hacia Europa y Asia, llevado por los pájaros y las migraciones humanas. Fue uno de los frutales más apreciados por los griegos y con el Imperio Romano se extendió a regiones muy diversas. En la actualidad, el cerezo se encuentra difundido por numerosas regiones y países del mundo con clima templado, entre los que se incluye España (Nogueroles, 2005).

El cerezo pertenece a la Familia Rosaceae y dentro de ésta al Género *Prunus*. El árbol es caducifolio y puede llegar a los 25 m de altura. Las hojas son simples, ovado-oblongas, acuminadas, de 7,5-12,5 cm de longitud y 3,5-5 cm de altura, fasciculadas en el extremo de cortas ramillas. Al caer las hojas adquieren una tonalidad rojizo-anaranjada muy decorativa. Las flores son blancas de 2-3 cm de diámetro que aparecen antes o al tiempo que las hojas. El fruto es una drupa de color rojo negruzco, globoso o con figura de corazón. El hueso es globoso, casi liso.

Existen muchas variedades de cerezas, cada una de ella con unas características muy peculiares, grandes, pequeñas, rojas, anaranjadas, dulces, ácidas, etc. Al igual que ocurre en la mayoría de los cultivos, las variedades existentes de cerezas son muy extensas, por lo que esta diversidad provoca la selección de las variedades más comerciales para la producción y venta de este fruto. Dicha selección, solamente en España y según el Ministerio de Agricultura, abarca alrededor de 50 variedades que suelen ser las que combinan mejor el aspecto, tamaño y la calidad (MAPA, 2005). Tanto por ser cada día mayor la demanda en fresco y por la industria conservera, el cerezo aumenta su presencia año tras año. En España, es famoso el Valle del Jerte (Cáceres) como zona productora, aunque hay otras como las del Valle de Ebro, Sierra de Alicante, Zona de Jiloca en Teruel, etc.

Para describir las variedades se ha tomado como referencia la 'Burlat'. Entre las variedades comercializadas a nivel mundial se encuentran el '4-70 o Marvin', 'Bing' y 'Van', mientras que las variedades cultivadas tradicionalmente en España principalmente son:

- 'Napoleón'. Muy estimada para la mesa y confitura.
- 'Ambrunesa'. De consistencia crujiente y sabor dulce.
- 'Burlat'. De fruto grueso, pulpa roja, firme, jugosa y azucarada.

Otras variedades de nueva introducción son:

- 'Stella'. Semiprecoz.
- 'Lapins'. Precoz y muy productiva.
- 'Sunburst'. Buena tolerancia al transporte.
- 'Duroni 3'. De floración tardía y buena productividad.
- 'Early Van Compact'. De floración precoz, muy productiva y de muy buena calidad gustativa.
- 'Summit'. De floración semitardía y muy abundante y excelente sabor.

La época de maduración tiene un efecto importante sobre los parámetros de calidad, por lo que se han establecido 4 categorías (Espada et al., 2005):

- A) **Variedades de recolección temprana:** entre las variedades de recolección temprana y utilizando como referencia la variedad 'Burlat', destaca por su elevada precocidad de entrada en producción y el peso medio de fruto la variedad 'Early Lory' y 'Marvin'. Como inconveniente citar la alta sensibilidad de sus frutos al agrietado por efecto de la lluvia durante la fase de maduración.
- B) **Variedades de recolección semi-temprana:** en esta época de maduración destacan por la precocidad de entrada en producción las variedades: 'New Star', 'Garnet', 'Celeste', 'Sumesi' y 'Prime Giant', la cual destaca por el gran tamaño o peso del fruto. Un factor común a las variedades pertenecientes a esta época de maduración, es el bajo porcentaje de frutos dobles que se obtienen.

- C) **Variedades de estación:** en esta época donde hay una afluencia masiva de fruto en el mercado, para que los frutos alcancen buen precio en origen, además de la calidad gustativa y la firmeza, el calibre es el parámetro básico que lo determina. Si tomamos como referencia a la variedad 'Stark Hardy Giant', antigua variedad, todavía cultivada en todas las áreas tradicionales de cerezo y conocida por los cultivadores como 'Starking', destacan por su producción: 'Sunburst', 'Sonata', 'Van' y 'Sommerset'. En esta época de maduración, el porcentaje de frutos dobles en la cosecha de todas las variedades ensayadas es muy bajo.
- D) **Variedades de recolección tardía:** entre las variedades que maduran a partir de la segunda quincena de junio destacan por su precocidad de entrada en producción: 'Sweetheart', 'Skeena' y 'Lapins'. En este grupo de variedades el porcentaje de frutos agrietados de la cosecha y el de frutos doble es muy bajo.

## 1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA

La producción de cerezas a nivel mundial es de 2.294.455 toneladas que generan unos ingresos totales de 2.916.876.000 \$. Entre los países productores de cerezas, Turquía contribuye en un 25 % a la producción mundial de cerezas, seguido por Estados Unidos, Irán e Italia, siendo España el sexto país productor con una superficie cultivada en producción de 23.637 hectáreas, con una producción de más de 97.000 toneladas. En la Figura 1 se representan las toneladas producidas de cerezas producidas por los 15 países con mayor producción y el valor económico alcanzado en estos países.



Figura 1. Producción mundial de cerezas (toneladas) y valor económico (1000\$) de los 15 países con mayor producción. Año 2013. Fuente: FAOSTAT (<http://faostat.fao.org>).

España es uno de los principales productores de cerezas en Europa puesto que diversas regiones españolas presentan condiciones óptimas para la producción de cerezas. Los precios más elevados se pueden obtener en países del norte de Europa, como Noruega o Suiza, debido a que no son productores y a su elevado poder adquisitivo. Por tanto el productor busca cerezas de desarrollo temprano, que lleguen lo antes posible a estos mercados y así obtener el máximo beneficio del cultivo (Remón et al., 2003).

En España, las provincias donde el cultivo del cerezo tiene mayor importancia son Cáceres, Zaragoza, Barcelona, Castellón, Alicante, Rioja, Granada, Jaén, Salamanca y León. La superficie total dedicada al cultivo de cerezo y guindo en España ha superado las 25.000 hectáreas (MAGRAMA, 2013). En la Figura 2 se muestran las principales áreas productoras en España siendo Extremadura la Comunidad Autónoma con mayor producción, seguida por Aragón, Cataluña, Andalucía, Galicia, Castilla León y Comunidad Valenciana. De las 97.489 toneladas de cerezas producidas en España, aproximadamente el 90 % se destinan al consumo en fresco frente al 10 % que se derivan hacia la industria agroalimentaria.



Figura 2. Producción de cerezas en España, donde se representan las toneladas producidas por comunidades autónomas para el año 2013. Fuente: Anuario de Estadística Agraria. Avance 2014 ([www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es)).

Como se observa en la Figura 2, en Extremadura se produce el 37 % de la producción total de España. El Valle de Jerte es bien conocido por producir cerezas tipo “Picota”, que son comercializadas bajo la denominación de origen protegido (D.O.P) “Cerezas del Jerte”. Son cerezas de elevada calidad y entre las principales variedades autóctonas de “Picota” se encuentran ‘Ambrunes’, ‘Pico Negro’, ‘Pico Colorado’ y ‘Pico Limón Negro’. Las “Picotas” suponen aproximadamente el 60 % de la producción de cerezas en esta comunidad, y la variedad más importante en términos de volumen de producción es ‘Ambrunes’ con 3.500 toneladas por año, y cuyo destino final es el consumo en fresco. El 40 % restante de cerezas cultivadas en esta zona se debe al cultivo de otras variedades comerciales que han sido introducidas para mantener una industria competitiva, siendo la más importante ‘Sweetheart’ (Serradilla et al., 2012).

La Comunidad Valenciana tiene una producción de 5.033 toneladas y Alicante es la provincia con mayor superficie cultivada produciendo el 70 % de las cerezas en dicha Comunidad. La mayor producción de cerezas en la provincia de Alicante se encuentra en la zona amparada bajo la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Cerezas de la

montaña de Alicante". Esta zona de producción posee unas características agroclimáticas especiales características para el cultivo del cerezo, entre las que destacan el relieve montañoso, los suelos de alto contenido en carbonato cálcico y escasez de materia orgánica, un clima mediterráneo templado, con temperaturas frías (13-15,5 °C) y mayor número de precipitaciones (350-650 mm) que en el resto de la Comunidad (Consejo regulador IGP Cerezas montaña de Alicante).

### **1.3. EL FRUTO: CRECIMIENTO Y MADURACIÓN**

Desde el punto de vista comercial y nutricional los frutos son considerados productos alimenticios importantes debido al gran aporte de nutrientes tales como azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales, y otros componentes que no son nutrientes, incluyendo fibra dietética y metabolitos secundarios, con efectos beneficiosos para la salud. Desde el punto de vista botánico, los frutos son muy diversos y van desde cápsulas de semillas secas (tanto dehiscentes como no dehiscentes) hasta frutos relativamente grandes carnosos complejos que han desarrollado colores brillantes y aromas complejos para hacer al fruto atractivo para los animales y contribuir así a la dispersión de las semillas. En muchos casos, los frutos se forman a partir de un ovario fecundado aunque otras partes de la flor o inflorescencia también pueden contribuir a la formación del fruto, tales como los tejidos del receptáculo y sépalos en la fresa y la piña, respectivamente. Sin embargo, en pocas especies los frutos cuajan y maduran sin fertilización y sin el desarrollo de semillas. Este es el caso de los frutos partenocárpicos como por ejemplo, higos, pera, manzana, melocotón, cereza, uva de mesa, plátanos y cítricos (Agustí, 2008).

#### **1.3.1. Crecimiento del fruto**

El tiempo requerido para el crecimiento del fruto varía ampliamente entre especies y genotipos, y oscila entre 3 semanas para fresa hasta 60 semanas en naranja Valencia, pero en los frutos de muchas especies este intervalo está alrededor de 15 semanas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la tasa de crecimiento del fruto



varía mucho entre estaciones, condiciones medioambientales, prácticas de cultivo e incluso entre frutos de la misma planta.

El crecimiento del fruto implica varios grados de división y expansión celular. Durante el cuaje del fruto, cuando una flor ha sido polinizada con éxito (y excepcionalmente en frutos partenocárpico), el fruto se convierte en un sumidero de carbohidratos y muchos de sus tejidos se convierten en meristemáticos. En algunos frutos, tales como grosellas y moras, la división celular se completa con el momento de la polinización, aunque en otros la división celular ocurre durante un corto tiempo después de la polinización y en otros incluso, la división celular continúa durante toda la vida del fruto, siendo este el caso del aguacate. De este modo, en muchas especies, el aumento del tamaño celular es el que más contribuye a la expansión total del fruto. Por ejemplo, en uva, el incremento del número de células representa la duplicación del tamaño de la fruta, mientras que el aumento del volumen celular representa un aumento de tamaño de 300 veces (Monselise, 1986).

El crecimiento del fruto en las plantas puede seguirse mediante medidas físicas tales como peso, longitud, diámetro y volumen. Dependiendo del tipo de fruto la evolución de estos parámetros sigue una curva simple o doble-sigmoide. En general, el tipo doble-sigmoide es característico de frutos de hueso tales como cereza, melocotón, albaricoque, ciruelas y aceitunas, al igual que algunos frutos sin hueso tales como uva y grosella. En esta curva de crecimiento doble sigmoide, se pueden establecer cuatro estados diferentes (S1-S4), como se observa en la Figura 3 para cerezas 'Sonata'. S1 es la primera fase de crecimiento exponencial y se caracteriza por la división y elongación celular. S2 muestra escaso o nulo crecimiento del fruto pero el endocarpo se endurece para formar un hueso sólido. S3 se corresponde con la segunda fase de crecimiento exponencial debido a la expansión celular, mientras que en la fase S4 la tasa de crecimiento del fruto disminuye y se produce la maduración del fruto.

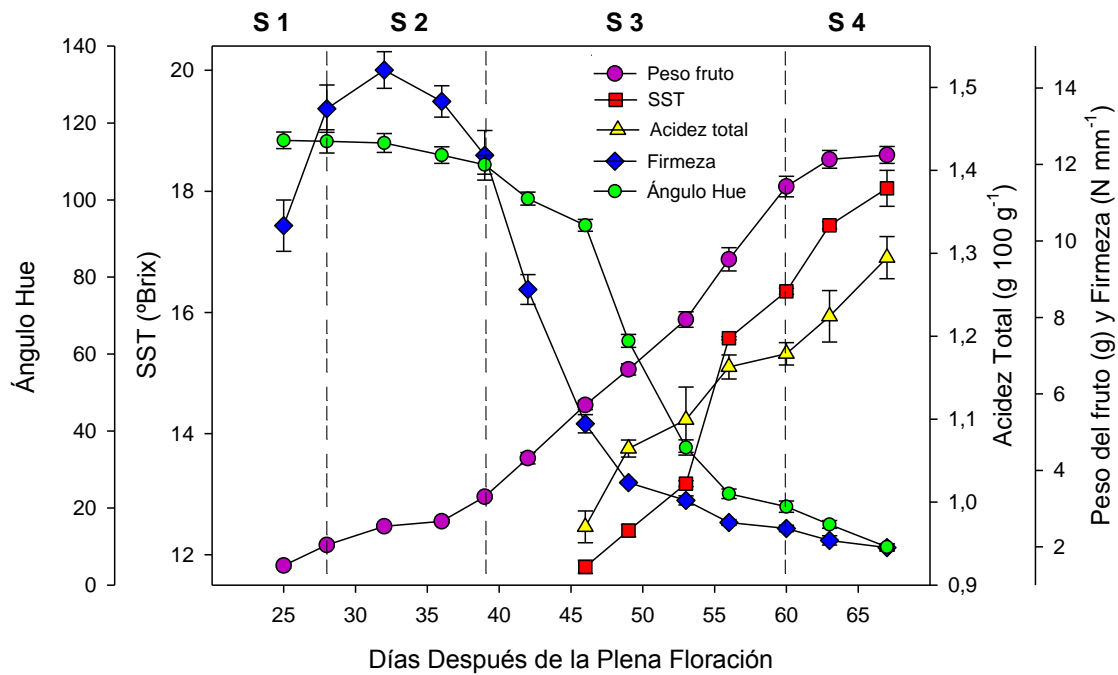


Fig. 3. Evolución del peso del fruto, firmeza, contenido en sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT) durante el desarrollo y maduración en el árbol de cereza 'Sonata'. S1-S4 representan los 4 estados de crecimiento doble sigmoide en esta fruta de hueso. (Adaptada de Díaz-Mula et al., 2009).

Por el contrario, los frutos que contienen una gran cantidad de semillas (tales como manzana, pera, naranja, pimiento, plátano, aguacate, fresa, mango y limón) muestran una curva de crecimiento simple sigmoide. Como se muestra en la Figura 4, el pimiento presenta una primera fase de división celular y crecimiento lento seguida por una segunda fase de crecimiento rápido debido a la expansión celular y finalmente una tercera fase que reduce el crecimiento hasta alcanzar el tamaño máximo del fruto.

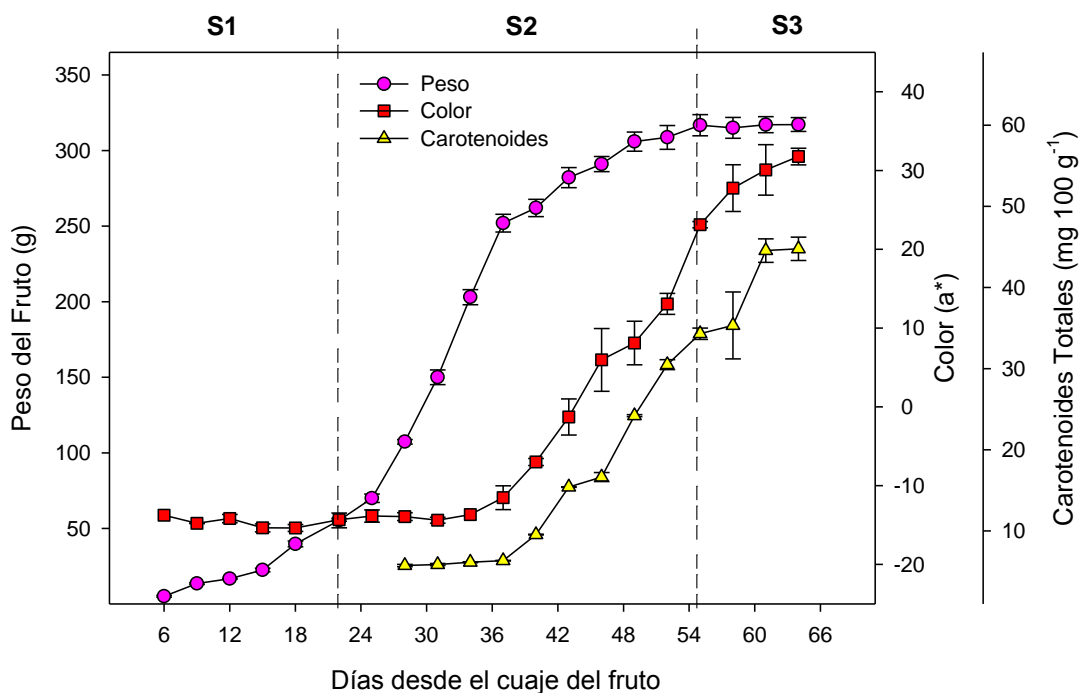


Fig. 4. Curva de crecimiento simple sigmoide de pimiento, en la que se muestra la evolución del peso del fruto, color y contenido de carotenoides totales durante su desarrollo y maduración (Adaptada de Serrano et al., 2010).

### 1.3.2. Maduración del fruto

La maduración del fruto es un proceso genéticamente programado que se produce en las etapas tardías de maduración e involucra una serie de cambios fisiológicos, bioquímicos y sensoriales que dan lugar al desarrollo de un fruto maduro, comestible y con parámetros de calidad deseables (Brady, 1987; Giovannoni, 2001). Los cambios bioquímicos y fisiológicos específicos que se producen varían entre especies aunque generalmente incluyen el aumento de azúcares y disminución del contenido de ácidos, ablandamiento (debido a la hidrólisis parcial de la estructura de la pared celular), cambios de color (pérdida de color verde y desarrollo de color amarillo, naranja, rojo y otros colores característicos dependiendo de la especie y variedad), síntesis de aromas volátiles (proporcionando el aroma característico), e incremento de la susceptibilidad a la infección de patógenos, sugiriendo que los mecanismos genéticos subyacentes que regulan la maduración de los frutos son comunes en frutos de especies diferentes (Adams-Philips et al., 2004; Giovannoni, 2004, Valero y Serrano,

2010; 2013). Estos cambios asociados con la maduración del fruto tienen lugar en distintas partes de la célula y están muy coordinados, incluyendo la expresión de genes nucleares y plástidicos y mecanismos de acción de hormonas vegetales (Cruz-Hernández y Paredes-López, 2012).

Sin embargo, desde el punto de vista del consumidor, la maduración del fruto podría definirse como la secuencia de procesos que dan lugar a cambios en el color, textura, sabor, aroma, azúcares, ácidos orgánicos y otros componentes nutritivos que ocurren desde las últimas etapas de crecimiento del fruto y las primeras etapas de la senescencia, y que hacen que el fruto sea atractivo y apetecible para el consumo humano (Tucker y Grierson, 1987).

El tiempo de maduración varía con las etapas de desarrollo del fruto. En frutos con un patrón de crecimiento simple-sigmoide, la maduración usualmente ocurre durante la fase final de crecimiento lento. Sin embargo, en frutos con una curva de crecimiento doble sigmoide, la maduración empieza durante la fase S3, junto con la segunda fase de crecimiento rápido.

### 1.3.3. Cambios de color

Los cambios de color se deben a la pérdida de clorofilas, y la síntesis de nuevos pigmentos característicos de cada fruto, como antocianinas o carotenoides. Las antocianinas se localizan en las vacuolas y son las responsables del color azul, rojo o morado de los frutos. Son pigmentos hidrosolubles del grupo de los flavonoides, concretamente, son derivados glicosilados del catión 3, 5, 7, 3'-tetrahidroxiflavilium (Figura 5).

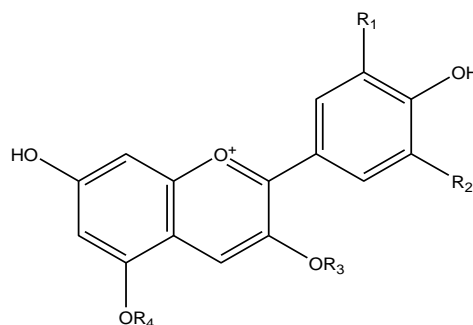


Fig. 5. Estructura general de antocianidina (catión 3, 5, 7, 3'-tetrahidroxiflavilium).

Las agliconas libres se denominan antocianidinas y son muy reactivas con azúcares para formar los glicósidos, que son las diferentes antocianinas. Las principales agliconas encontradas en los frutos son pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina, mientras que los azúcares con los que reaccionan para formar las antocianidinas son D-glucosa, L-ramnosa, D-galactosa, D-xilosa y arabinosa (Francis, 1989; Welch et al., 2008). En la Tabla 1 se muestran diferentes sustituyentes para R1 y R2 para formar las diferentes agliconas libres que después serán glicosiladas para formar antocianinas.

Tabla 1. Diferentes sustituyentes para R1 y R2 para formar las diferentes agliconas libres que después serán glicosiladas para formar antocianinas.

R1	R2	Aglicona	Abreviatura	Color
H	H	Pelargonidina	Pg	Naranja
OH	H	Cianidina	Cy	Naranja-Rojo
OMe	H	Peonidina	Pn	Naranja-Rojo
OH	OH	Delfinidina	Dp	Malva-Rojo
OMe	OH	Petunidina	Pt	Malva-Rojo
OMe	OMe	Malvidina	Mv	Púrpura
R3 y R4 pueden ser H o azúcar				

En general, la concentración de antocianinas aumenta durante la maduración en aquellos frutos de colores rosados, rojos y morados, tanto si se trata de frutos climatéricos como no climatéricos, aunque existen grandes variaciones en el contenido total de antocianinas en el momento de la recolección comercial entre especies y variedades así como en la antocianina mayoritaria. Así, las fresas tienen comparativamente menor concentración de antocianinas totales, oscilando entre 20 y 60 mg 100 g<sup>-1</sup>, dependiendo de la variedad, siendo la antocianina mayoritaria cianidín 3-glucósido (Lopes da Silva et al., 2007). En moras se han encontrado mayores concentraciones, desde 70 a 200 mg 100 g<sup>-1</sup>, dependiendo de la variedad, siendo la antocianina mayoritaria cianidín 3-glucósido contribuyendo a más del 70 % (Fan-Chian y Wrolstad, 2005). Sin embargo, las mayores variaciones entre variedades han sido

encontradas en cerezas, con concentraciones que oscilan entre 2 y 300 mg 100 g<sup>-1</sup>, desde variedades de colores claros a oscuros, siendo en todas ellas las antocianinas mayoritarias cianidín 3- rutinósido y cianidín 3-glucósido (Gao y Mazza, 1995; Mozetič et al., 2002; Chaovanalikit y Wrolstad, 2004; Serrano et al., 2009). La concentración de antocianinas aumenta con la maduración y este aumento se refleja en los cambios de color como se puede observar en la Figura 3. También se han encontrado grandes variaciones entre variedades de uvas de mesa (6-200 mg 100 g<sup>-1</sup>), e incluso la antocianina mayoritaria fue diferente dependiendo de la variedad (cianidín 3-glucósido, peonidín 3-glucósido o malvidín 3-glucósido) (Carreño et al., 1997; Orak., 2007). Para las variedades de ciruela de color rojo-púrpura la concentración de antocianinas totales es mayor en la piel (100-800 mg 100 g<sup>-1</sup>) que en la pulpa (2-100 mg g<sup>-1</sup>), y en ambos tejidos la antocianina mayoritaria es cianidín 3-glucósido (Tomás-Barberán et al., 2001; Vizzoto et al., 2007; Díaz-Mula et al., 2008). Las antocianinas están también presentes en melocotones en concentraciones que oscilan entre 1,5 y 260 mg 100 g<sup>-1</sup> de genotipos con piel blanca a roja (Vizzoto et al., 2007). Sin embargo, estos niveles de antocianinas podrían ser considerados como orientativos, ya que las condiciones ambientales y prácticas de cultivo tienen un efecto importante sobre el contenido de antocianinas para cada fruto en particular. Por ejemplo, el contenido de antocianinas totales de Cabernet Sauvignon fue determinado como 108 y 194 mg 100 g<sup>-1</sup> en años consecutivos, 2001-2002 (González-Neves et al., 2004).

Por otra parte, los carotenoides o tetraterpenoides son el grupo de pigmentos más amplio en la naturaleza y están presentes en todos los organismos fotosintéticos, tanto en hojas como en frutos y en flores. Los carotenoides están formados por terpenoides con 40 átomos de carbono formados a partir de ocho isoprenoides C<sub>5</sub> unidos cabeza con cola, dando lugar a una molécula simétrica y se localizan en los cromoplastos. En su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (xantofilas) y el rojo (licopeno). Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos sólo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el β-caroteno, el licopeno, etc.), mientras que las xantofilas contienen además oxígeno (por ejemplo la luteína). A los carotenoides generalmente se les denomina con nombres comunes que incluyen las variaciones estructurales de

los anillos laterales, en especial la posición del enlace doble, y pueden ser acíclicos (licopeno), monocíclicos ( $\gamma$ -caroteno) o dicíclicos ( $\alpha$ - o  $\beta$ - caroteno). La Figura 6 muestra la estructura de los principales carotenoides encontrados en frutos, que existen generalmente bajo la forma trans (forma más estable), aunque también se encuentran isómeros cis a concentraciones mucho menores (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

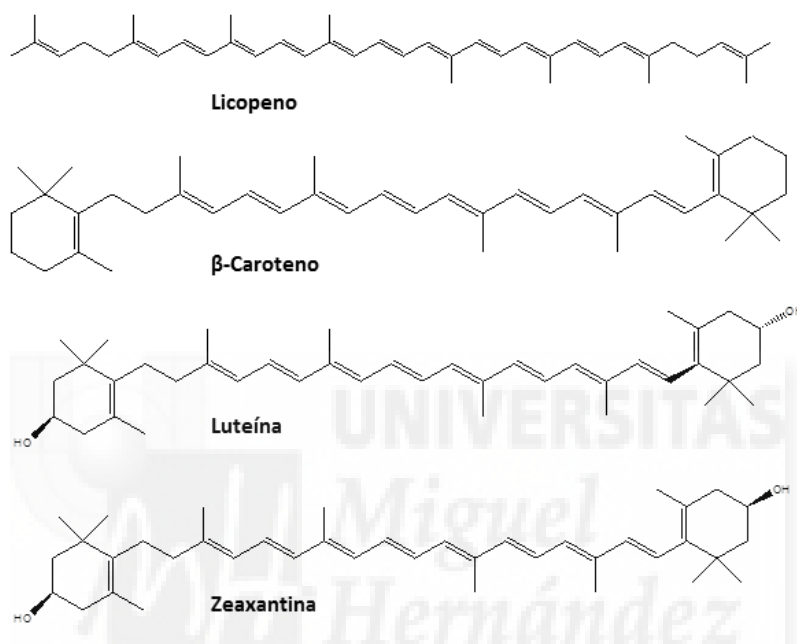


Fig. 6. Estructura química de los principales carotenoides encontrados en frutos.

En frutos y hortalizas la composición de carotenoides varía cualitativa y cuantitativamente. En general, las hortalizas verdes tienen un patrón de carotenoides más definido, ya que en ellas los carotenoides mayoritarios son luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y noxantina, mientras que los frutos tienen una composición de carotenoides mucho más compleja y variable.

Durante la maduración del fruto, se han encontrado grandes variaciones no sólo en el perfil de pigmentos sino también en la concentración, con un incremento general durante el proceso de maduración para todos los frutos y mayor contenido en la piel que en la pulpa. Así, en la Figura 4 se puede observar el aumento de la concentración de carotenoides totales durante el desarrollo y maduración del pimiento. Sin embargo, existen diferencias importantes en la concentración de

carotenoides que presentan los frutos en el estado de madurez comercial, entre especies y entre variedades de una misma especie, y también se ve afectada por diversos factores tales como condiciones ambientales y de cultivo. La concentración de carotenoides totales, expresada en mg 100 g<sup>-1</sup> oscila entre 0,1-4 en albaricoque (Kurz et al., 2008), y 2-7 en tomate (Kaur et al., 2006), 0,02-5 para *Citrus* sp (Fanciullino et al., 2008), 1,5-3 para papaya (De Souza et al., 2008), 0,1-2 para níspero (Zhou et al., 2007), 0,2-20 para pimiento (Topuz y Ozdemir, 2007; Serrano et al., 2010), y 3-7 para sandía (Perkins-Veazie et al., 2001).

#### 1.3.4. Composición de ácidos y azúcares

El crecimiento y expansión de las células de los frutos depende de la acumulación de agua a favor de gradiente de potencial hídrico, como consecuencia del potencial osmótico que genera en ellos la acumulación activa de solutos, como azúcares y ácidos orgánicos. En este aspecto es fundamental el papel de la vacuola, ya que es en este orgánulo donde se acumulan la mayor parte de los compuestos responsables del sabor, como son los azúcares y los ácidos orgánicos (Shiratake y Martinola, 2007). De este modo, los niveles de azúcares y ácidos orgánicos son factores importantes que determinan el sabor del fruto maduro, y el contenido relativo de estos constituyentes depende de la actividad y de la interacción del metabolismo de ácidos y azúcares (Rhodes, 1980).

La acumulación de azúcares durante el crecimiento y maduración del fruto, se produce a partir de los compuestos que se reciben por el floema, fundamentalmente sacarosa en la mayoría de las plantas y sorbitol en plantas de la familia de las rosáceas, dando lugar al aumento de sólidos solubles totales (SST). Así, los SST incrementaron de 40 a 75 días después del cuajado del fruto en cerezas 'Sonata' y al final del proceso de maduración (Figura 3). Sin embargo, se encuentran diferencias importantes en el contenido de azúcares en el momento de la recolección comercial entre especies y variedades. Por ejemplo, en distintas variedades de ciruelas el contenido de azúcares osciló entre 11 y 16 % (Crisosto et al., 2007; Díaz-Mula et al., 2008), en distintas variedades de tomate entre 4 y 7,5 °Brix (Guillén et al., 2006; Zapata et al., 2008) y en variedades de cerezas entre 13 y 20 % (Usenik et al., 2008; Serrano et al., 2009).



Sin embargo, en otros frutos como en mango, kiwi y plátano, entre otros, los azúcares recibidos se emplean para sintetizar almidón, que se acumula en los amiloplastos y es hidrolizado posteriormente en la fase de maduración, cuando ya ha terminado el crecimiento del fruto (Berüter, 2004). Además, en algunos frutos la sacarosa acumulada se hidroliza en fructosa y glucosa durante la maduración y en otros, el sorbitol se convierte en glucosa y/o fructosa, por lo que el azúcar predominante en el fruto maduro depende de la especie, como se puede ver en la Tabla 2.

Tabla 2. Azúcares y ácidos orgánicos mayoritarios de algunos frutos.

Fruto	Azúcar	Ácido orgánico	Referencias
Uva de mesa	Glucosa	Ácido tartárico	Valero et al., 2006.
Fresa, arándano, persimon mango, tomate (domesticado), <i>Citrus spp.</i> (lima, naranja, limón)	Fructosa	Ácido cítrico	Zapata et al., 2008; Valero y Serrano, 2010.
Albaricoque, ciruela, nectarina, melocotón, níspero	Sacarosa	Ácido málico	Amorós et al., 2003; Valero y Serrano, 2010.
Tomate (silvestre)	Sacarosa	Ácido cítrico	Kortstee et al., 2006.
Granada, cereza	Fructosa	Ácido málico	Mirdehgham et al., 2006; Serrano et al., 2005a.

Además, la proporción relativa de estos tres azúcares es un factor determinante en la apreciación del dulzor de los frutos, puesto que la fructosa es un 80% más dulce que la sacarosa, mientras que la glucosa es sólo un 60 % más dulce que la glucosa (Yamaguchi et al., 1970).

En general, los frutos son muy ácidos durante su fase de desarrollo, debido a la acumulación de ácidos orgánicos en las vacuolas, aunque durante la fase de maduración el sabor ácido disminuye debido a la acumulación de azúcares y al descenso en el contenido de ácidos, aunque hay excepciones en este patrón general de disminución del contenido de ácidos (Valero y Serrano, 2010). Así, como se muestra en la Figura 7 la acidez disminuye durante la maduración de las ciruelas y nísperos en el árbol, al igual que en la mayoría de los frutos carnosos, mientras que aumenta en las

cerezas y los pimientos. También en los limones la acidez total (AT) aumenta durante la maduración del fruto en el árbol.

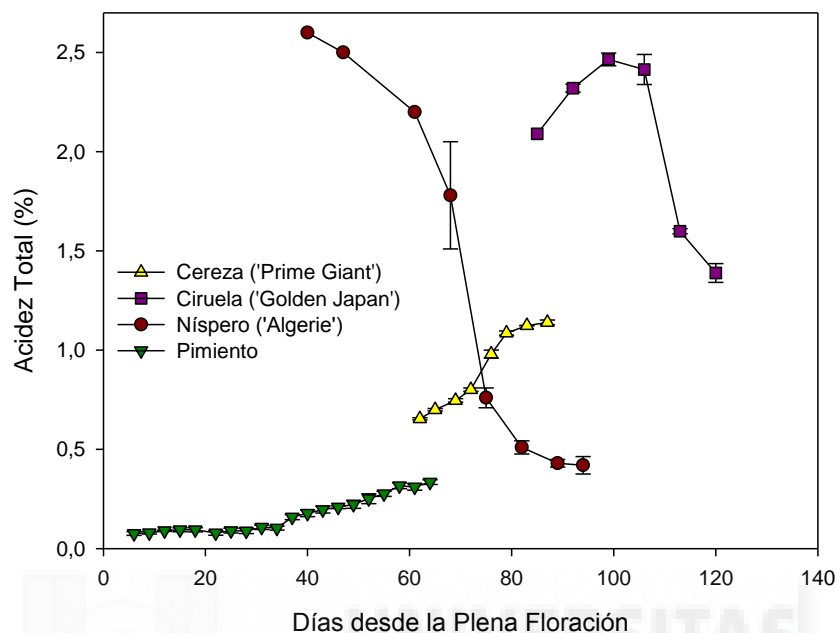


Fig. 7. Acidez total durante el crecimiento del fruto en el árbol, de cerezas, ciruelas y nísperos. (Adaptado de: Amorós et al., 2003; Díaz-Mula et al., 2008; Serrano et al., 2009).

Además, existen diferencias importantes en el contenido total de ácidos en el fruto maduro, entre especies y entre variedades de una misma especie. En diferentes variedades de tomate la acidez oscila entre 0,4 y 1,7 % (Guillén et al., 2006; Zapata et al., 2008), en cerezas entre 1,0 y 1,5 % (Usenik et al., 2008; Serrano et al., 2009), y en ciruelas entre 0,7 y 1,6 % (Crisosto et al., 2007; Díaz-Mula et al., 2009). Otro factor que influye en el grado de acidez de un fruto es el tipo de ácido que acumule, siendo los más importantes el ácido málico, cítrico, tartárico, quínico, oxálico, fumárico y succínico, ya que cada tipo de ácido tiene un sabor diferente que contribuye al sabor general del fruto. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de los ácidos mayoritarios en diferentes frutos.

El ácido málico es el mayoritario en frutos de la familia Rosaceae, a la que pertenecen los géneros *Prunus* (ciruela, albaricoque, melocotón, nectarina y cereza) y *Malus* (manzana y pera). Por el contrario, el ácido cítrico es el mayoritario en frutos del

género *Citrus*, como naranja, limón, lima, mandarina o pomelo, en los cuales supone el 50-80 % del total de ácidos, aunque en otros frutos como el tomate, el mango y pequeñas bayas, también es el cítrico el predominante. Finalmente el ácido tartárico es el ácido predominante en la uva y disminuye durante la maduración, siendo el nivel de acidez total un parámetro muy apropiado para determinar el estado de madurez de este fruto (Mato et al., 2005; Valero et al., 2006).

No obstante, con fines prácticos la relación entre sólidos solubles y acidez total (SST/AT) es un índice de madurez más apropiado que sólo considerar el valor de sólidos solubles o el valor de acidez de forma independiente, ya que está más relacionado con la percepción del sabor por los consumidores. Por otro lado, la proporción de los diferentes ácidos también es importante, puesto que por ejemplo, el cítrico enmascara la percepción de la sacarosa y de la fructosa y el málico aumenta la percepción de la sacarosa (Lobit et al., 2003).

### **1.3.5. Cambios en la firmeza**

Durante el desarrollo de los frutos de hueso se producen cambios en la firmeza que reflejan diferentes estados fisiológicos del mismo como se puede observar en cerezas (Figura 3). Durante la primera fase de desarrollo la firmeza aumenta hasta alcanzar un máximo en la fase II, que coincide con la lignificación del endocarpo. A partir de entonces, la firmeza disminuye progresivamente durante la fase III o fase de crecimiento rápido del fruto, y este descenso de firmeza se atribuye al aumento del tamaño de las células del mesocarpo que hacen que este tejido sea cada vez menos compacto y por tanto, se refleja en una disminución de la firmeza. Finalmente, durante la fase IV de desarrollo, la firmeza continúa disminuyendo debido a la degradación parcial de los componentes de la pared celular, en un proceso característico de la maduración y estimulado por el etileno en los frutos climatéricos (Díaz-Mula et al., 2008).

Entre los sucesos metabólicos responsables de los cambios texturales que dan lugar al ablandamiento de frutos durante la maduración destacan los siguientes: pérdida en la presión de turgencia debido a la acumulación de solutos en el apoplasto,

modificaciones en la relación simplato/apoplasto, degradación de almidón y modificaciones en la estructura y dinámica de la pared celular. La contribución relativa de cada uno de estos procesos en el ablandamiento no está clara, y probablemente depende de la especie, aunque los cambios en la composición y estructura de la pared celular, especialmente la resistencia mecánica de la pared celular y la adhesión célula-célula, se consideran los factores más importantes causantes del ablandamiento característico de la maduración (Lasbrook, 2005; Brummell, 2006; Goulao y Oliveira, 2008; Valero y Serrano, 2010; Paniagua et al., 2014).

Cuando se examinan al microscopio electrónico las células del fruto, el primer cambio que se observa durante la maduración es la disolución de la lámina media, lo que disminuye la adhesión celular, y a continuación se desorganiza la estructura ordenada de la pared celular primaria y ésta se hace más delgada. Sin embargo, la hidrólisis y desestructuración de la pared celular varía considerablemente entre especies, e incluso entre variedades, aunque, en general, las enzimas más implicados en el ablandamiento son las que degradan las pectinas, principalmente poligalacturonasa (PG), pectin metilesterasa (PME),  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL), y pectato liasa (PL), seguidas de aquellas que actúan sobre la celulosa y hemicelulosas de la pared celular primaria como xiloglucano endotransglicosilasa (XETs), endo- $\beta$ -1,4-glucanasas (EGases),  $\beta$ -D-xilosidasa, endo- $\beta$ -manan transglicosilasa (manasas) y expansinas (Brummell y Harpster, 2001; Lasbrook, 2005; Brummell, 2006; Prasanna et al., 2007; Goulao y Oliveira, 2008; Mercado et al., 2011; Panigua et al., 2014).

Es probable que los frutos de todas las especies tengan todas estas enzimas implicadas en la degradación de los componentes de la pared celular y de la lámina media, actuando todas ellas de manera cooperativa para producir los procesos de ablandamiento durante la maduración. Sin embargo, existen diferencias entre especies y entre variedades de una misma especie en cuanto a la actividad relativa de estas enzimas, ya que su expresión está regulada en el tiempo y en cada fruto en particular (Brummell, 2006; Bennett y Labavitch, 2008; Goulao y Oliveira, 2008). En general, la despolimerización de la matriz de glicanos que ocurre durante las fases tempranas de la maduración, que es seguida por la rotura de las cadenas laterales del

ramnogalacturonano I (RGI), la de-esterificación de los homogalacturonanos (HGA) y la despolimerización de las pectinas ocurre por la acción de las exo- y endo-PG. Además, en los frutos que conservan una estructura crujiente cuando están maduros (manzana, sandía pimienta) el grado de solubilización y despolimerización de las pectinas es bajo, por lo que se mantienen las células unidas por la lámina media común, sugiriendo que la integridad de estas conexiones es fundamental para que se mantenga el atributo de crujibilidad. Por el contrario en aquellos en los que la firmeza disminuye mucho y son muy blandos en estado maduro (cereza, fresa, kiwi) la degradación de la lámina media es total (Mercado et al., 2011; Paniagua et al., 2014).

### **1.3.6. Aromas**

Los aromas de los frutos, debidos a compuestos volátiles, se perciben por el epitelio olfativo, un área relativamente pequeña de la mucosa que recubre la superficie de la cavidad nasal. La mayoría de los frutos producen un número bastante grande de compuestos aromáticos y su composición cuantitativa y cualitativa determina en conjunto el aroma del fruto. En algunos casos se producen cantidades muy pequeñas de un determinado compuesto que están por debajo del límite de detección de algunas técnicas e instrumentos, pero que pueden ser percibidos por el olfato humano (Zhu et al., 2005; Goff y Klee, 2006; Song y Forney, 2008; Defilippi et al., 2009).

La composición de aromas de un fruto incluye compuestos químicos como alcoholes, aldehídos, ésteres, cetonas y terpenos y es un atributo fundamental en la calidad y en su aceptación por los consumidores. Además, el aroma característico de un fruto normalmente no se encuentra en el fruto verde, sino que se adquiere a lo largo de la maduración, como consecuencia de la síntesis de compuestos volátiles en sus tejidos. Estos compuestos volátiles se pueden clasificar como primarios o secundarios, si se pueden identificar en el fruto intacto o después de la rotura de los tejidos, respectivamente. En este sentido, los aromas primarios son los que puede oler el consumidor antes de comerse el fruto, mientras que los aromas secundarios serían los que se pueden percibir después de romper los tejidos, mediante la masticación (Song y Forney, 2008).

Se han identificado un gran número de compuestos químicos como compuestos volátiles en los frutos, basados en su abundancia cuantitativa y umbrales olfativos. Así, los frutos cítricos poseen un aroma único que raramente se encuentra en otros frutos, y que se debe fundamentalmente a mono y sesquiterpenos, como limoneno y valenceno, que son los mayores componentes de los aceites esenciales de limones y naranjas, respectivamente, que se acumulan en bolsas oleíferas en el flavedo y en las vesículas de zumo (Sharon-Asa et al., 2003). En mango, también son los mono y sesquiterpenos los componentes mayoritarios del aroma, aunque algunos aldehídos que se encuentran a muy baja concentración le imparten su olor característico a aceite verde (Pino et al., 2005; Pandit et al., 2009). En tomate, se han identificado más de 400 compuestos volátiles, siendo los más importantes hexanal, hexenal, hexenol, 3-metilbutanal, 3-metilbutanol, metil nitrobutano y isobutil tiazol y todos ellos aumentan con la maduración (Zhu et al., 2005; Birtic et al., 2009). Asimismo, en la manzana el contenido de volátiles aumenta con la maduración, aunque el perfil de aromas cambia de un predominio de aldehídos en el fruto verde a un predominio de ésteres en el fruto maduro (Villatoro et al., 2008). El hexil acetato y el butil acetato son los principales responsables de aroma en los albaricoques (Aubert y Chanforan, 2007; Defilippi et al., 2009), y en las ciruelas los compuestos aromáticos más abundantes son guanidina, 3-hexen-1-ol y los ésteres 4-hexen-1-ol acetato y hexil acetato (Lozano et al., 2009). Finalmente, en las cerezas los compuestos más importantes que contribuyen al aroma son hexanal, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexenol, 1-penten-3-ol, nonanal, (E,Z)-2,6-nonadienal, alcohol bencílico, linalool y benzaldehído, aunque existen diferencias en el perfil y concentración de aromas de cada compuesto particular dependiendo de la variedad y estado de maduración (Matteis et al., 1992; Girard y Kopp, 1998; Bernalte et al., 1999; Serradilla et al., 2010; Sun et al., 2010).

### **1.3.7. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante**

Los alimentos de origen vegetal contienen cientos de constituyentes no nutrientes con actividad biológica significativa, generalmente llamados compuestos bioactivos o fitoquímicos con actividad antioxidante. La palabra antioxidante es cada vez más popular en la sociedad moderna, a medida que gana publicidad gracias a los

medios de comunicación debido a los beneficios para la salud que se le otorgan. De acuerdo con su definición, el término antioxidante se refiere a la sustancia que se opone a la oxidación o inhibe las reacciones promovidas por oxígeno y peróxidos, aunque según una definición biológicamente relevante un antioxidante es sustancia sintética o natural que previene o retrasa la reacción de oxidación en sistemas biológicos.

Los radicales libres son moléculas con uno o más electrones desapareados, tales como anión superóxido ( $O\bullet^{2-}$ ), radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ) y radical peroxilo ( $ROO\bullet$ ), entre otros, llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos radicales libres se generan durante el metabolismo normal de las células, en procesos inflamatorios y por la acción de los macrófagos. Tienen corta duración y son muy reactivos, ya que van constantemente en busca del electrón que les falta causando la oxidación en otras moléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Por tanto, los radicales libres están implicados como mediadores en los procesos de envejecimiento, en el deterioro degenerativo y crónico, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, diabetes, hipertensión, cáncer, artritis, disfunción cerebral, etc. En las células hay sistemas de defensa contra estos radicales libres. El sistema de defensa primario interactúa directamente con los radicales libres dañinos y los elimina tan pronto como se forman, evitando así el daño en los componentes celulares del cuerpo. En el sistema primario de defensa están involucradas enzimas como catalasa [EC 1.11.1.6, CAT] y superóxido dismutasa [EC 1.15.1.1, SOD], pequeñas moléculas como vitamina C, E y otros componentes minoritarios presentes en los frutos, generalmente conocidos como antioxidantes. El sistema secundario de defensa consiste en otras enzimas y antioxidantes que reparan las biomoléculas ya dañadas. Por tanto, los problemas que dan lugar al envejecimiento celular y a las enfermedades anteriormente comentadas sólo surgen cuando el equilibrio entre radicales libres y sistemas de defensa se inclina hacia el lado de los radicales libres (Valko et al., 2007).

En este sentido, el consumo de frutas y vegetales ha mostrado tener efectos protectores contra diversas enfermedades crónicas asociadas con el envejecimiento, incluyendo arterioesclerosis, enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas, aumento de la presión arterial, úlceras, enfermedades neurodegenerativas, disfunción

cerebral e inmune e incluso contra enfermedades bacterianas y virales. El impacto de estas investigaciones científicas se ha traducido en muchos estudios epidemiológicos para correlacionar la presencia de estos compuestos bioactivos con la paliación de una o más de estas enfermedades (Wang et al., 2011; Landete et al., 2011; Bennet et al., 2012). La protección que los frutos y vegetales proporcionan contra estas enfermedades degenerativas ha sido atribuida a diversos compuestos antioxidantes, que varían ampliamente en la estructura química y función en los tejidos de las plantas entre los que destacan vitaminas (C y E), carotenoides, compuestos fenólicos y glucosinolatos (compuestos con grupos tiol -SH) (Fernández-Panchon et al., 2008; Maiani et al., 2009; Asensi-Fabado et al., 2010; Serrano et al., 2011). En este sentido, existe una creciente evidencia científica de que estos antioxidantes presentes en la dieta pueden ser los responsables de los efectos beneficiosos de la dieta Mediterránea (Shen et al., 2015).

Los compuestos fenólicos son un grupo muy numeroso de compuestos vegetales, que participan en las respuestas defensivas de la planta contra diferentes tipos de estrés, como daños físicos, radiación ultravioleta o los ataques de agentes patógenos y contribuyen al sabor y color en los alimentos derivados de las plantas. Los fenoles son compuestos orgánicos aromáticos que contienen uno o más grupos hidroxilo como grupo funcional. En la naturaleza se han identificado miles de compuestos fenólicos diferentes con gran variación en sus estructuras. De todos ellos, los flavonoides son el grupo más importante, con cerca de 8.000 compuestos diferentes ya identificados. En la Tabla 3 se muestran los grupos y subgrupos fenólicos de los fenoles más comunes encontrados en los frutos que se clasifican según su estructura básica.



Tabla 3. Principales grupos fenólicos y subgrupos en frutos.

Grupos fenólicos	Subgrupos	Compuestos
Ácidos fenólicos (C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> )		Ácido gálico, ácido elágico,
Ácidos hidroxicinámicos (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> )		Ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico
Estilbenos (C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> )		Cis-resveratrol, trans-resveratrol
Flavonoides (C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> )	Flovanoles	Quercetina, kaempferol, miricetina, isoramnetina
	Flava-3-oles	Catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas
	Flavonas	Apigenina, luteolina, chrysoeriol
	Flavononas	Naringenina, hesperidina, eriodictiol
	Antocianidinas	Cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina, peonidina, pelargonidina

El contenido en compuestos fenólicos en los frutos varía durante la maduración del fruto en el árbol, así como durante el almacenamiento post-cosecha y procesamiento. Así, los fenoles totales aumentan durante la maduración en pimientos, cerezas y ciruelas (tanto en variedades amarillas como en rojas), pero disminuyen en tomate. Esta evolución de los fenoles totales se reflejó en la actividad antioxidante total de los extractos hidrosolubles (AAT-H), que evolucionó de forma similar encontrándose una relación directa entre la concentración de fenoles totales y la AAT-H en una amplia gama de frutos (Gil et al., 2002; Cevallos-Casals et al., 2006; Deepa et al., 2007; Díaz-Mula et al., 2008; 2009a; Serrano et al., 2010). Dado que los fenoles poseen propiedades antioxidantes, los mayores beneficios para la salud se alcanzarán si los frutos se consumen en un estado óptimo de maduración.

Como se cita en el apartado 1.3.3, en general, la concentración de antocianinas aumenta durante la maduración del fruto, aunque existen grandes variaciones entre especies y variedades así como en la antocianina mayoritaria. Las antocianinas tienen mayor actividad antioxidante que vitamina C y E u otros compuestos fenólicos, siendo la cianidín 3-glucósido la antocianina con mayor actividad antioxidante. Parece ser que su elevada capacidad antioxidante se debe a su capacidad para capturar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno de sus grupos fenólicos. En muchos frutos de color rojos-púrpura como moras, frambuesas rojas y negras, cerezas y ciruelas, se han encontrado elevadas correlaciones entre los valores de capacidad antioxidante

(AAT-H) y el contenido en antocianinas lo que indica que las antocianinas son unos de los compuestos hidrosolubles que más contribuyen a la actividad antioxidante de los frutos (Wang y Lin, 2000; Díaz-Mula et al., 2008; Serrano et al., 2009)

Del mismo modo, en el apartado 1.3.3. se explica el aumento general del contenido en carotenoides totales durante la maduración del fruto, existiendo diferencias importantes especies y variedades. Además, determinados factores externos también pueden afectar al contenido de carotenoides. También se han encontrado correlaciones entre los carotenos y la AAT liposoluble (AAT-L) tanto en la pulpa como en la piel de variedades de ciruelas (Díaz-Mula et al., 2008), así como en tomate (Lenucci et al., 2006), pimiento (Serrano et al., 2010) e incluso en legumbres (Wu et al., 2004; Cho et al., 2007).

Las vitaminas son un tipo de nutrientes esenciales requeridos para las funciones bioquímicas y fisiológicas del cuerpo humano. Puesto que los humanos no pueden sintetizarlas deben ser aportadas en la dieta, en las concentraciones adecuadas. Las vitaminas se dividen en liposolubles (A, D, E y K) e hidrosolubles (C y B), siendo los tocoferoles (vitamina E) y carotenoides (pro-vitamina A) las principales vitaminas antioxidantes liposolubles en frutos y vegetales, y el ácido ascórbico (vitamina C) la principal vitamina antioxidante hidrosoluble, aunque recientes investigaciones indican que la vitamina D también podría tener un papel como antioxidante (Asensi-Fabado et al., 2010). Los frutos verdes inmaduros contienen mayores concentraciones de ácido ascórbico que los maduros, coincidiendo esta disminución con el principio de los cambios de color, como se ha observado en tomate (Serrano et al., 2008b), aunque la concentración de ácido ascórbico aumentó a lo largo del proceso de maduración en pimiento (Serrano et al., 2010), en albaricoques, en melocotones y en papayas (Lee et al., 2000).

Por otro lado, los glucosinolatos son otro grupo de compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante. Se han identificado más de un centenar de glucosinolatos diferentes aunque todos ellos presentan una estructura común con un grupo sulfonado, una  $\beta$ -D- tioglucosa y una cadena lateral variable de naturaleza aminoacídica. Los principales glucosinolatos son alifáticos (derivados de L-metionina), aromáticos (derivados de L-fenilalanina y L-tirosina) e indólicos (derivados de L-

triptófano). Los glucosinolatos más importantes se encuentran en el género *Brassica* y son derivados de la metionina. Los principales factores que influyen en los niveles de glucosinolatos son genéticos, ecofisiológicos (irradiación, temperatura, agua y nutrición), condiciones de almacenamiento y procesamiento (Moreno et al., 2006).

### 1.3.8. Fisiología de la maduración

Desde el punto de vista fisiológico, los frutos se clasifican en dos grupos: climatéricos y no climatéricos, que difieren en sus patrones de las tasas de producción de etileno y en las tasas de respiración. En este sentido, los frutos climatéricos, tales como tomate, aguacate, banana, melocotón y ciruela, entre otros, muestran un rápido incremento de la tasa de respiración y producción de etileno en el inicio de la maduración. En estos frutos, el etileno se considera la hormona responsable del proceso de maduración. Por el contrario, los frutos no climatéricos, tales como cereza, granada, pimiento, uva y cítricos, entre otros, presentan una disminución gradual en su patrón de respiración y producción de etileno durante el proceso de maduración (Barry y Giovannoni, 2007; Giovannoni, 2007; Symons et al., 2012). El control hormonal de la maduración en frutos no climatéricos se ha relacionado con el ácido abscísico (ABA) y los brasinosteroides (Ban et al., 2003; Symons et al., 2012). Este comportamiento fisiológico de los frutos tiene gran relevancia en las tecnologías post-cosecha que son efectivas para preservar la calidad como se expondrá más adelante (Martínez-Romero et al., 2007a; Valero y Serrano, 2010).

En plantas vasculares superiores, el etileno es sintetizado a partir del aminoácido metionina, que es convertido en S-adenosil-metionina (SAM) por la adición de adenina y consumo de ATP (Figura 8). El SAM es después transformado en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por la enzima ACC-sintasa (ACS) con la generación del subproducto 5'-metiltioadenosina, que es reciclado a metionina (Ciclo de Yang). Por tanto, el etileno puede producirse a niveles elevados incluso con una pequeña reserva de metionina libre. Finalmente, el ACC es oxidado a etileno por la ACC-oxidasa (ACO, anteriormente llamada EFE, enzima formadora de etileno) (Yang y Hoffman, 1984; Abeles et al., 1992; Pech et al., 2010).

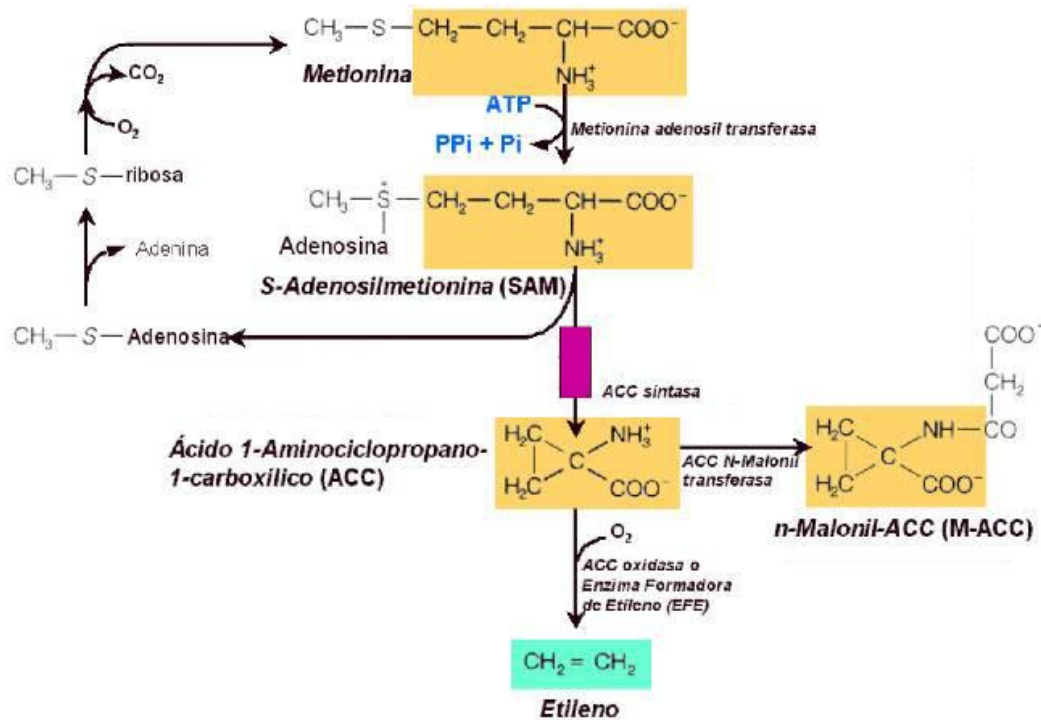


Fig. 8. Ruta de biosíntesis de etileno (Adaptada de Taiz y Zeiger, 2006).

Al igual que las demás hormonas, el etileno se une a un receptor y la señal se transduce a través de un complejo mecanismo para desencadenar respuestas biológicas específicas. En frutos climatéricos, la primera respuesta es estimular su propia síntesis por lo que la producción de etileno aumenta rápidamente, lo que se denomina producción autocatalítica de etileno y el inicio del proceso de maduración empieza en esta etapa (Yang y Hoffman, 1984).

La biosíntesis y acción del etileno puede disminuirse o retrasarse por compuestos químicos de diferente estructura, que actúan a diferentes niveles, como puede ser disminuir la actividad de ACS y ACO, bloquear la unión del etileno con su receptor, desviar el precursor común SAM hacia la biosíntesis de poliaminas o eliminar el etileno de la atmósfera que rodea a los frutos (Martínez-Romero et al., 2007a; Ruduś et al., 2013).

La distinción entre frutos climatéricos y no climatéricos no es absoluta ya que también hay una serie de especies en las que diferentes variedades y cultivares muestran ambos comportamientos, climatérico y no climatérico. De este modo, la

ciruela se considera un fruto climatérico, aunque algunas variedades como 'Shiro', 'Golden Japan' y 'TC Sun' se comportan como frutos con climaterio suprimido (Abdi et al., 1997; Zuzunaga et al., 2001; Díaz-Mula et al., 2008). Del mismo modo, los melones presentan tanto genotipos climatéricos como no climatéricos. Así, *Cucumis melo* var. 'Cantalupensis' tiene una tasa rápida de maduración y una corta vida útil con una tasa de producción de etileno alta, mientras que *C. melo* var. 'Inodorous' es incapaz de producir etileno autocatalítico y tiene una lenta tasa de maduración asociada con una larga vida útil. Además, la herencia del carácter climatérico parece ser dominante ya que cruzando melones climatéricos con no climatéricos se obtienen melones climatéricos, aunque el control genético involucrado aún es desconocido (Pech et al., 2008).

Como se ha comentado anteriormente, la maduración de frutos climatéricos está regulada por etileno, aunque hay procesos de maduración etileno dependientes e independientes. En muchos frutos, tanto climatéricos como no climatéricos, la coloración de la pulpa, acumulación de azúcar y pérdida de acidez son procesos etileno independientes, mientras que el desverdizado y la coloración amarillenta de la piel, ablandamiento de la pulpa, desarrollo de la zona de abscisión del pedúnculo, formación de aroma y respiración climatérica son total o parcialmente etileno dependientes (Barry y Giovannoni, 2007; Pech et al., 2008; Pirrello et al., 2009; Grierson et al., 2013). Por otro lado, en melones y manzanas procedentes de plantas silenciadas en la expresión de los genes ACS o ACO, se ha encontrado una fuerte reducción de la síntesis de etileno pero aún persistió un ablandamiento residual significativo, indicando la presencia de un componente etileno independiente del ablandamiento. Además, en tomates ACO antisentido la producción de etileno fue inhibida al 97 % pero no el ablandamiento, y el 3 % del etileno residual fue suficiente para activar los mecanismos de degradación de la pared celular. Estos ejemplos ponen de manifiesto que los componentes etileno dependientes o independientes del ablandamiento son diferentes entre especies y probablemente entre variedades y que en los frutos no climatéricos operan los mismos mecanismos enzimáticos en la degradación de la pared celular, aun cuando presentan una tasa de producción de etileno muy baja.

Por otra parte, la degradación de clorofilas y síntesis de pigmentos tales como antocianinas y carotenoides son también procesos etileno dependientes, incluso en frutos no climatéricos como uvas, pimientos y cítricos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que aunque la síntesis de etileno no aumenta durante la maduración de estos frutos, sí cambiaría su capacidad de respuesta al etileno y así, también el etileno podría ser capaz de inducir los cambios fisiológicos asociados con su maduración (Adams-Phillips et al., 2004; Barry y Giovannoni, 2007; Paul et al., 2012).

Claramente, el etileno es requerido para la maduración normal de muchos frutos y en su ausencia el proceso de maduración falla haciendo el producto inaceptable. Sin embargo, una vez iniciada, la maduración es un proceso de un solo sentido y el etileno estimula la sobre maduración y podredumbre, dando lugar a una rápida pérdida de la calidad de la fruta. Por tanto, en condiciones de almacenamiento post-cosecha es importante controlar los efectos del etileno, no sólo en frutos, sean climatéricos o no, sino también en vegetales y cultivos ornamentales para mantener su calidad y ampliar las posibilidades de almacenamiento.

#### **1.4. CALIDAD DEL FRUTO EN LA RECOLECCIÓN Y CAMBIOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO**

Los productos agrícolas pueden ser clasificados como: (a) duraderos, entre los que se encuentran, cereales, granos, oleaginosas y leguminosas de grano, y (b) productos perecederos, que comprenden órganos tales como frutos carnosos, vegetales, rizomas y tubérculos. Los productos cosechados son esencialmente órganos de la planta con funciones fisiológicas muy diferentes procedentes de tejidos de la planta madre. En los frutos, cuando se establece el proceso de maduración-senescencia, se produce el deterioro de calidad y aumenta progresivamente su susceptibilidad a la podredumbre causada por deterioro microbiano y patógeno. En este sentido, la calidad del fruto requerida dependerá del uso final, y su calidad post-cosecha está determinada por factores pre-cosecha y por un adecuado manejo, procesamiento, envasado y venta. En la sociedad moderna actual, las frutas son

sometidas a una amplia variedad de procesos, que empiezan con la separación de la planta madre y terminan en el plato de los consumidores, afectando todos ellos a su frescura y calidad.

#### **1.4.1. Concepto de Calidad**

En la actualidad, hay una conciencia creciente sobre la calidad de los alimentos, en particular en el sector de las frutas y la salud, que exige grandes esfuerzos en actividades de investigación relacionadas con la producción de productos de calidad, y en su preservación durante la comercialización, así como en la evaluación de parámetros de calidad y en su integración en los procesos de producción. El concepto de calidad del fruto se usa frecuentemente durante toda la cadena post-recolección (desde la cosecha hasta la venta), pero su significado es distinto dependiendo del nivel en el que se use: agricultores, productores, manipuladores, envasadores, distribuidores, minoristas, mercados, y finalmente y el más importante, los consumidores. Sin embargo, para todos ellos, el término calidad está relacionado con el grado de excelencia y ausencia de defectos de un producto fresco, que implica atributos sensoriales (apariencia, color, textura, sabor y aroma), nutritivos (componentes químicos usados para obtener energía) y propiedades funcionales (vitaminas y otros fitoquímicos no nutrientes). Shewfelt (1999) sugirió que las características propias del producto determinan su calidad, pero la aceptabilidad por parte del consumidor está determinada por su percepción y satisfacción. Así, la calidad puede ser orientada desde el punto de vista del producto o del consumidor. La calidad orientada al producto se mide generalmente con la ayuda de determinaciones analíticas, mientras que la calidad orientada al consumidor se basa en la aceptación o disposición del consumidor a comprar los productos frescos. Los productos ofrecidos al consumidor en el mercado deben cumplir con ciertos requisitos externos que son percibidos por los sentidos de la vista y el tacto, ya que son importantes para la decisión de compra. En este sentido, las pautas dietéticas recomiendan el consumo de frutas frescas (campaña 5 al día) que no se lograrán si los consumidores muestran cierta insatisfacción con la calidad del producto, debido al desarrollo de características indeseables.

En el mercado de productos frescos, existen unas especificaciones estándar mínimas de calidad en muchos países; sin embargo, debido al carácter internacional del mercado de productos frescos, hay una tendencia hacia la estandarización internacional de los grados de calidad. La Comisión Europea fue una de las primeras organizaciones en desarrollar normas o estándares internacionales para frutas frescas (MAFF, 1996). Muchos de estos estándares han sido adoptados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Normalmente, los estándares requeridos para múltiples puntos de venta son más estrictos que estas normas mínimas, y son definidas por los vendedores para los proveedores. Desde el punto de vista de la calidad del fruto, los factores que limitan el almacenamiento y vida útil son los siguientes: pérdida de peso, apariencia, textura, sabor/aroma y podredumbre. Además, los daños mecánicos producidos durante el proceso de manipulación pueden acelerar los cambios en los factores anteriores con una reducción más rápida en la calidad del fruto. Estos cambios son debidos a procesos fisiológicos o tecnológicos relacionados con la maduración del fruto y finalizan con la senescencia, y por tanto determinan la vida útil de un fruto en particular. El aumento de la vida de almacenamiento de los frutos se lleva a cabo a través del desarrollo de nuevas tecnologías post-cosecha dirigidas a reducir la tasa de deterioro y a mantener las características deseables de los frutos dando lugar a una gran expansión de las oportunidades de la industria para suministrar frutas de alta calidad en los mercados locales e internacionales.

#### **1.4.2. Pérdida de peso**

Las pérdidas de peso se producen fundamentalmente por el proceso de transpiración, que es la pérdida de agua en forma de vapor a través de la superficie del fruto, y que viene determinada por las diferencias de potencial hídrico entre el interior del fruto y la atmósfera que lo rodea. La atmósfera interna del fruto está saturada con vapor de agua, pero el aire circundante está menos saturado, existiendo un gradiente a lo largo del cual el vapor de agua se mueve desde el producto al aire que lo rodea, debido a las diferencias de potencial hídrico entre ambos, y que dependen de la temperatura y humedad relativa.



La transpiración se produce a través de la cutícula, estomas o lenticelas. Cuando los frutos están unidos a la planta, el agua que pierden por transpiración la recuperan absorbiéndola del suelo, mientras que después de la recolección no pueden recuperar el agua perdida. Los vegetales con una gran superficie en relación a su volumen, tales como los cultivos de hoja, sufrirán mayores pérdidas de agua y de manera más rápida que los frutos esféricos. Además, la estructura y composición específica de la cutícula así como la suberización de la peridermis limitan considerablemente la tasa de transpiración. Por otra parte, los frutos con piel gruesa pueden perder una cantidad considerable de humedad en la piel sin comprometer la calidad de la pulpa, como es el caso de cítricos y plátanos. Por tanto, la especie del fruto es un factor clave que determina la tasa de pérdida de peso, pero también existen diferencias entre variedades, ya que por ejemplo, ciruelas 'Black Diamond' sufren mayores pérdidas de peso que 'Golden Japan' (Ben-Yehoshua, 1987; Valero y Serrano, 2010).

La pérdida de peso es una de las causas más importantes responsable del deterioro de cerezas, la cual incrementa la susceptibilidad del fruto a las podredumbres fúngicas. De hecho, las pérdidas de peso en cerezas es mayor que en otros frutos debido a la menor resistencia a la difusión de su piel (Crisosto, 1992). Los frutos varían en el porcentaje de agua que pueden perder antes de que la calidad sea marcadamente reducida (Acker, 2002). Así, pérdidas de peso del 3 al 6% son suficientes para producir una pérdida notable de calidad en muchos frutos, y muy pocos pueden llegar a perder hasta un 10 % o más de humedad y resultar aún comerciales. La pérdida de agua va en detrimento de la calidad vegetal ya que se produce una pérdida de turgencia, que afecta a las propiedades de textura y a los atributos de color, haciéndola menos deseable para los consumidores que demandan productos frescos y turgentes. Además, las pérdidas de peso se traducen en pérdidas económicas y en la aparición de otras alteraciones que van asociadas a la deshidratación del producto. Por tanto, después de la recolección es fundamental mantener los productos vegetales en unas condiciones que minimicen las pérdidas por transpiración. En este sentido, la transpiración será menor cuanto menor sea la temperatura y mayor la humedad relativa del aire en las cámaras de conservación, ya

que al disminuir la temperatura ambiente y al aumentar la humedad relativa del aire aumenta el potencial hídrico de la atmósfera y la diferencia de potencial hídrico entre el interior de los tejidos vegetales y la atmósfera será menor, por lo que la transpiración disminuirá. Por ello es importante colocar los productos vegetales en cámaras frigoríficas lo antes posible después de la recolección, ya que en las cámaras la temperatura es baja y la humedad del aire relativamente elevada. Otro factor importante es la velocidad del aire, ya que si existe aire en movimiento sobre la superficie del vegetal la transpiración aumenta, porque el aire elimina la capa límite de la superficie del fruto.

### **1.4.3. Color**

El color define el valor estético de la comida, predetermina la expectación del consumidor de su sabor y modula el apetito. Por lo tanto, es fundamental mantener la apariencia natural del fruto hasta su llegada al consumidor. Sin embargo, durante el almacenamiento de los frutos el color puede ser alterado por la acción de la luz, temperatura, oxígeno, iones de metales y enzimas (Stintzing y Carle, 2004).

Para investigar el impacto del color en la calidad de un modo sistemático es necesario medirlo objetivamente, así como cuantificar la concentración de los pigmentos responsables. En este contexto, el color indica la apariencia visual del producto mientras que los pigmentos o colorantes son los compuestos químicos que imparten el color observado. El sistema CIEL\*a\*b (Comisión Internacional de la Iluminación, Vienna) ha sido adoptado por la industria alimentaria para medir el color de los alimentos. Si bien este sistema no da una definición precisa del color, es muy efectivo para medir diferencias de color y el seguimiento de los cambios de color durante el almacenamiento (Wrolstad et al., 2005). El incremento en el parámetro a\* refleja el cambio de verdoso a rojo anaranjado, mientras que la disminución de croma está relacionado con el oscurecimiento de la piel.

La mayoría de los frutos experimentan cambios de color como parte del proceso de maduración como se ha comentado anteriormente en el apartado 1.3.3, y que continúa después de la recolección. Un fruto inmaduro es generalmente verde (el

llamado color de fondo) y en muchos tipos de fruto, el color verde se vuelve más claro durante la maduración debido a la degradación de la clorofila, por ejemplo, en manzanas, peras, uvas y papaya. Estos cambios de color afectan tanto a la piel como a la pulpa, y en muchos casos el color del fruto es un indicador claro de su calidad y vida útil, ya que la intensificación del color característico de cada fruto le confiere el aspecto de un fruto sobre-maduro y de poca calidad (Valero y Serrano, 2010).

#### **1.4.4. Firmeza**

Los cambios en textura que se producen normalmente durante el crecimiento y desarrollo en el árbol continúan durante el almacenamiento post-cosecha de los frutos, debido a cambios en los componentes químicos de la lámina media y la pared celular primaria, por acción de enzimas hidrolíticas que degradan pectinas, celulosa y hemicelulosas, como se comentó en el apartado 1.3.

Sin embargo, existen diferencias en el tipo y grado de la modificación de los polisacáridos de la pared celular y en la expresión y regulación de enzimas modificadoras de la pared celular dependiendo del tipo de fruto, e incluso entre variedades de la misma especie. Así, por ejemplo, frutos como el limón o el pepino sufren menos pérdida de firmeza que el tomate o los frutos de hueso (albaricoque, melocotón, nectarina y ciruela). En este sentido, la especie de fruto es un factor importante que determina la tasa de ablandamiento. Es interesante destacar que, diferentes variedades de la misma especie también pueden mostrar comportamientos diferentes, y así por ejemplo ciruelas de la variedad 'Black Diamond' muestran una pérdida de firmeza mucho mayor que ciruelas 'Golden Japan' (Valero y Serrano, 2010).

El excesivo ablandamiento del fruto es uno de los principales factores responsables de las limitaciones de su vida útil, almacenamiento y comercialización, ya que los consumidores prefieren frutos con textura elevada, firmeza y crujientes. Además, el ablandamiento acelerado también contribuye a un aumento de la aparición de daños físicos durante la manipulación, y aumenta la susceptibilidad a plagas y enfermedades (Goulao y Oliveira, 2008).

#### 1.4.5. Flavor, Sabor y Aroma

Además de la apariencia externa y cambios en la textura de los frutos, el aroma y flavor se están convirtiendo en factores clave para determinar la elección de compra de un fruto. Además de los azúcares y ácidos orgánicos, los aromas volátiles también contribuyen al flavor del fruto. Cuando un fruto es consumido, la interacción de sabor, olor y la sensación de textura proporciona una sensación general que se define mejor como "flavor". En general se acepta que si no se ha alcanzado o se ha excedido antes del consumo la vida útil teniendo en cuenta el flavor, el fruto no será aceptado por el consumidor.

Los compuestos responsables del sabor generalmente son no volátiles a temperatura ambiente. Por tanto, interactúan sólo con los receptores del sabor localizados en las papilas gustativas de la lengua. Las cuatro percepciones básicas del gusto son proporcionados por compuestos: ácidos, dulces, amargos y salados. El sabor es un atributo del fruto considerado como un indicador de calidad y no puede ser aislado de otras características el producto. El sabor es un atributo interno que no puede determinarse por medidas no destructivas, y además existe una gran variación de sabor entre frutos recolectados en la misma fecha y de la misma planta, debida a diferencias en su estado de maduración.

La mayoría de agricultores y comercializadores usan la determinación de °Brix para medir los SST, que estima sobre todo el contenido de azúcares en un fruto y por tanto proporciona el grado de dulzor. En este sentido, los consumidores están bastante familiarizados con el atributo de dulzor siendo este su atributo preferido. Sin embargo, en los últimos años la percepción del sabor por los consumidores no sólo está relacionada con el contenido de azúcares, sino también con su contenido en ácidos por lo que la AT se está convirtiendo en un factor importante. Asimismo, la proporción entre SST y AT ( $SST/AT$ ) se usa como un criterio de índice de maduración y del grado de aceptación de un fruto sobre todo en las cerezas (Crisosto et al., 2002; 2003).

Durante la post-cosecha hay un incremento general en el contenido de sólidos solubles, como se ha observado para nectarinas, albaricoques, kiwis y fresas (Aubert et al., 2003, Aubert y Chanforan, 2007; Park et al., 2006; Hernández-Muñoz et al., 2006).

Este incremento en sólidos solubles es mucho mayor en aquellos frutos que acumulan grandes cantidades de almidón durante el desarrollo en la planta, tales como mango o plátanos. En el caso de las cerezas, se han encontrado comportamientos diferentes para distintas variedades, ya que en unas se mantienen los SST, en otras aumentan e incluso en algunas otras disminuyen (Serrano et al., 2005; 2009; Díaz-Mula et al., 2009; Serradilla et al., 2012)

El comportamiento de la acidez de la fruta durante la maduración post-cosecha es más general, ya que se ha evidenciado una disminución neta en AT durante el almacenamiento en una amplia gama de frutos, como kiwi, fresa, tomate, cereza, ciruela, nectarina y diversas variedades de albaricoque, aunque la magnitud de la disminución depende en gran medida de la especie (Aubert et al., 2003, Aubert y Chanforan, 2007; Park et al., 2006; Hernández-Muñoz et al., 2006; Valero y Serrano, 2010). La reducción de la acidez asociada a la maduración post-cosecha ha sido atribuida al hecho de que los ácidos orgánicos son sustratos para el metabolismo respiratorio.

Las sustancias aromáticas son compuestos volátiles que son percibidos mediante los receptores del olor situados en el sistema olfativo de la cavidad nasal. Tanto el concepto de sustancias aromáticas como el concepto de sustancias gustativas, deben ser usados de forma independiente, ya que un compuesto podría contribuir al típico olor o sabor de un alimento, mientras que en otro alimento podría causar un olor o sabor defectuoso, o ambos, dando lugar a un mal sabor. En este sentido, uno de los mayores problemas en el almacenamiento post-cosecha y manipulación de frutos es el desarrollo de malos olores y pérdida de autenticidad. La apariencia y sensación de mal sabor está asociada con la sobre maduración y la acumulación de productos de la fermentación alcohólica, acetaldehído y etanol, que también son volátiles. En general, cuanto mayor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la producción de acetaldehído y etanol. En el caso del tomate, Krumbein et al., (2004) comprobaron que la intensidad del atributo de aroma de tomate característico incrementó durante el almacenamiento pero también el atributo indeseable mohoso, y sugirieron que el 2- isobutiltiazol podría ser responsable de la aparición de malos olores detectada en

tomates almacenados, que afectarían a la calidad sensorial, y por el contrario, el aumento de geranilacetona contribuiría al flavor característico del tomate.

De manera similar, durante el almacenamiento de albaricoque se produce un aumento general de sus compuestos volátiles, siendo los compuestos más importantes las lactonas (Aubert y Chanforan, 2007), al igual que en nectarinas (Aubert et al., 2003). En cerezas, se han encontrado cambios relevantes en los constituyentes del aroma asociados con un tiempo de almacenamiento largo, incluyendo un descenso en (*E*)-2-hexenal y 1-hexanol y un incremento de 2-metil-propanal, y 2-metil-butanal, con un impacto negativo sobre el flavor (Serradilla et al., 2010).

#### **1.4.6. Compuestos bioactivos**

Los compuestos bioactivos de frutos y vegetales varían dependiendo de las condiciones pre-cosecha (incluyendo métodos de cultivo, tiempo de la cosecha y condiciones climáticas), y de las condiciones post-cosecha (incluyendo almacenamiento y condiciones de transporte). Sin embargo, hay poca literatura disponible sobre los cambios en estos compuestos bioactivos con actividad antioxidante durante el almacenamiento post-recolección, y se han encontrado resultados contradictorios ya que, en algunos casos, los compuestos bioactivos disminuyen pero en otros aumentan. Así, por ejemplo en brócoli y uva de mesa el contenido de fenoles totales y AAT disminuye después del almacenamiento refrigerado, aunque el uso de tecnologías post-cosecha apropiadas pueden reducir las pérdidas de compuestos bioactivos y ATT como se comentará más adelante (Serrano et al., 2006; 2008a; Valero y Serrano, 2013). Por el contrario, en granadas, ciruelas y cerezas estos compuestos con AAT aumentan, y se asocia con el aumento de antocianinas totales (Lee y Kader., 2000; Cevallos- Casals et al., 2006; Amarowicz et al., 2009). Con respecto al ácido ascórbico, en general, los frutos recién recolectados contienen más vitamina C que tras el almacenamiento (Lee y Kader, 2000). Sin embargo, la concentración de ácido ascórbico y AAT aumenta durante la maduración post-recolección a 20 °C en ciruelas 'Tegan Blue' (Khan et al., 2009). Además, en cerezas se ha observado que recolectar los frutos en estado avanzado de maduración

conduce a una reducción de compuestos bioactivos y actividad antioxidante después de un tiempo de almacenamiento corto (Moreno et al., 2006; Cartea y Velasco, 2008).

#### **1.4.7. Podredumbres**

Como se ha comentado anteriormente, las frutas y vegetales contienen una amplia variedad de azúcares y ácidos orgánicos y elevada actividad de agua, y por tanto son buenos sustratos para el deterioro microbiológico. Sin embargo, el pH bajo de los frutos conduce a que su deterioro se deba principalmente a hongos, mientras que los vegetales, por el contrario, tienen valores de pH más cercanos a la neutralidad y por tanto, el daño puede ser causado por hongos y bacterias (Moss, 2008). En general, los daños por mohos en los frutos no suelen dar lugar a riesgos para la salud, ya que los frutos afectados normalmente son rechazados antes de consumirlos, pero las pérdidas económicas son considerablemente importantes.

Los patógenos fúngicos penetran en los tejidos del huésped a través de tres vías principales: 1) las heridas causadas por agentes bióticos y/o abióticos durante el crecimiento o almacenamiento, 2) las aberturas naturales de la epidermis tales como estomas, lenticelas, o entre la conexión del tallo y el pedúnculo, y 3) por la ruptura de la cutícula por el huésped. La aparición de podredumbres durante la post-cosecha es el resultado de la infección pre-cosecha latente o de la contaminación en la recolección, almacenamiento, transporte o comercialización y dará lugar a una reducción neta de la vida útil post-cosecha (Prusky y Lichter, 2008).

Hay una amplia gama de factores que influyen en la aparición de podredumbre y en su severidad, que pueden ser agrupados en tres niveles: en pre-cosecha (tipo y cantidad de inóculos, variedad, condiciones ambientales y climáticas y estado de madurez en la recolección), en la recolección (métodos manuales o mecánicos) y en post-recolección (procedimientos de manejo, condiciones de almacenamiento y tratamientos post-cosecha). Se estima que en países desarrollados, alrededor del 25% de todos los frutos percederos recolectados se pierden entre la recolección y el consumo, mientras este porcentaje aumenta hasta el 50-70% en países en desarrollo. Por tanto, es de especial importancia un manejo adecuado en post-cosecha para

proporcionar productos con elevados estándares de calidad y reducir la incidencia de podredumbres.

Las principales enfermedades que aparecen en cerezas en el periodo de post-cosecha, se deben al desarrollo de podredumbres causadas principalmente por varias especies de hongos del género *Monilia* spp (podredumbre parda), *Botrytis cinerea* (moho gris), *Penicillium expansum* (moho azul) (Venturini et al., 2002; Conte et al., 2009), y en menor medida por los hongos *Alternaria alternata* y *Rhizopus stolonifer*.

Hay numerosos métodos físicos y químicos que pueden ser usados para reducir los microorganismos presentes en los productos frescos y alargar su vida de almacenamiento, por ejemplo, cloro, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, radiación UV (Ramos et al., 2013), ozono (Miller et al., 2013; Glowacz et al., 2015), agentes antimicrobianos y antipardecimiento (Oms-Oliu et al., 2010). Durante muchos años los fungicidas sintéticos han sido usados para controlar podredumbres post-cosecha pero, la creciente preocupación de los consumidores sobre los residuos de fungicidas en cultivos hortícolas frescos y los efectos perjudiciales de los químicos para la salud y el medioambiente ha llevado a los científicos a buscar nuevas alternativas a estos fungicidas químicos.

## **1.5. TRATAMIENTOS POST-COSECHA PARA MANTENER LA CALIDAD DEL FRUTO**

Los productos vegetales frescos presentan una gran dificultad para mantener su calidad debido a la evolución de los procesos fisiológicos de la maduración y al ataque microbiano, como se ha comentado en el apartado anterior. Por ello, son necesarias nuevas técnicas y estrategias de conservación eficaces para reducir contaminaciones microbiológicas indeseables, retrasar el proceso de maduración y mantener la calidad organoléptica, nutricional y funcional del producto.



### **1.5.1. Conservación a baja temperatura**

Los frutos y vegetales son altamente perecederos, pero su tasa de deterioro además de depender de sus características y del nivel de estrés fisiológico causado por el proceso de recolección, está muy influenciado por la temperatura de conservación. Por tanto, es necesario almacenar los frutos bajo condiciones de frío y enfriarlos tan pronto como sea posible después de la recolección, a fin de detener los procesos de deterioro y senescencia y mantener un alto nivel de calidad que asegure la satisfacción de los consumidores. De hecho, el control de la temperatura es el factor más importante para mantener la calidad y reducir la tasa de deterioro de los productos cosechados. El principal efecto de la aplicación de temperaturas bajas durante el almacenamiento post-cosecha es una reducción del metabolismo del fruto y como consecuencia un retraso de la evolución de los parámetros relacionados con la sobre-maduración del fruto y pérdida de calidad. La tasa de respiración de un producto es dependiente de una amplia gama de variables, de las cuales la temperatura es considerada la más importante. Normalmente, se considera que la tasa de deterioro después de la cosecha está estrechamente relacionada con la tasa de respiración del producto y esto depende de la temperatura ya que la respiración, al igual que todas las rutas metabólicas se ralentiza al disminuir la temperatura (Kader, 2002). Además, la reducción de la temperatura de almacenamiento tiene la ventaja añadida de reducir la producción de etileno y la sensibilidad al etileno, lo que tiene especial importancia en los frutos climatéricos ya que esta hormona acelera el proceso de maduración y senescencia. Finalmente, al reducir la temperatura de conservación disminuye el potencial hídrico de la atmósfera de la cámara por lo que la transpiración del fruto será menor y se reducirán las pérdidas de peso.

Por todo ello, los productos vegetales necesitan ser almacenados a bajas temperaturas tan pronto como sea posible después de la recolección y mantener la cadena de frío durante todo el proceso de manipulación, empaquetado, conservación, transporte y venta. Así pues, es la tecnología de conservación post-recolección más antigua y la más usada en todo el mundo (Valero y Serrano, 2010). Sin embargo, frutos y vegetales tropicales y subtropicales son susceptibles a los tratamientos con temperaturas bajas, ya que sufren daños por frío, y su temperatura óptima de

conservación no puede ser tan baja como sería deseable, oscilando entre 8-12 °C dependiendo de la especie y variedad (Wang, 2010).

Sin embargo, la conservación a baja temperatura en la mayoría de los casos no es suficiente para mantener la calidad de los frutos el tiempo necesario para su transporte a lugares lejanos o durante un periodo de conservación que permita evitar la saturación de los mercados, por lo que son necesarias nuevas tecnologías de conservación combinadas con el frío, entre las que destacamos las que se comentan a continuación.

### **1.5.2. Tratamientos térmicos**

Los tratamientos térmicos pueden ser una herramienta post-cosecha que influye positivamente sobre determinados parámetros fisiológicos, bioquímicos, nutritivos y de calidad, ya que inhiben el proceso de maduración, e inducen resistencia a los daños por frío, y por tanto, permiten extender el tiempo de almacenamiento y comercialización (Lurie, 1998; Paull y Chen, 2000).

El tratamiento térmico se aplica antes del almacenamiento a baja temperatura, usando agua caliente, aire caliente o vapor caliente. La combinación de tratamiento térmico/tiempo de exposición para obtener los efectos deseados depende del tipo de fruto. Así, es necesaria una temperatura entre 39-53 °C y una duración de 10 minutos-12 horas para lograr un control de podredumbre efectivo en tomate, naranja, mango y pera, y para reducir daños mecánicos antes de la manipulación en ciruelas, mientras que temperaturas más altas actúan como método de cuarentena para insectos (46-58 °C). Además, es interesante destacar que en los últimos años, los tratamientos térmicos han mostrado un efecto positivo sobre el incremento de propiedades nutritivas y funcionales en algunos frutos tales como granada, tomate y mango (Valero y Serrano, 2010).

En general, se prefieren tratamientos térmicos suaves (38-55 °C) para reducir el proceso de maduración y/o mantener la calidad organoléptica del fruto, aunque la duración es muy variable, desde segundos (para manzana) a varios minutos (4-60 min),

para granada, tomate, cereza, pitaya y mango, y hasta 12 horas para melocotón (Valero et al., 2002b; Serrano et al., 2004a; Valero y Serrano, 2010).

En frutos climatéricos, la inhibición de la maduración por calor puede estar mediada por su efecto sobre la hormona de la maduración, etileno, y las enzimas responsables de su biosíntesis ACS y ACO (Lurie 1998; Serrano et al., 2004c). El mecanismo por el cual el calor retrasa y/o inhibe la producción de etileno es variable. Así, temperaturas en el rango de 35-38°C tienden a acumular ACC y a disminuir la producción de etileno, debido a la inhibición de la actividad ACC oxidasa. Sin embargo, mayores temperaturas inducen menor concentración de ACC, mediante la inhibición de la actividad ACS. Esto significa que ACS es menos sensible a los tratamientos térmicos que ACO. Además, las diferencias en la respuesta al calor entre ACS y ACO pueden estar relacionadas con diferencias en sus tasas de recambio (Paull y Chen, 2000).

### **1.5.3. Tratamientos con calcio**

El calcio es un nutriente esencial de la planta con funciones estructurales importantes, concretamente, la regulación de la permeabilidad de la membrana y procesos relacionados y el fortalecimiento de las paredes celulares. Los tratamientos con calcio representan un método seguro y potencialmente efectivo para incrementar la calidad y vida de almacenamiento en una amplia gama de especies frutales, ya que reducen el deterioro, ablandamiento, producción de etileno y tasa de senescencia. Las aplicaciones de calcio pueden realizarse por tratamientos pre-cosecha en el sistema de irrigación o por pulverización de la copa del árbol con soluciones de calcio, aunque estos tratamientos son más efectivos cuando se aplica el calcio directamente en la superficie del fruto, ya que se produce poca o nula translocación de calcio de las hojas al fruto (Kadir, 2004). Por otro lado, el calcio puede ser aplicado como tratamientos post-cosecha, por inmersión de frutos en soluciones de sales de calcio o por infiltración a vacío. Sin embargo, se producen algunos daños si se aplica calcio a elevadas concentraciones (Valero et al., 1998; Ferguson y Boyd, 2001; Serrano et al., 2004c; Bakshi et al., 2005). El efecto más importante de los tratamientos con calcio es mejorar la firmeza del fruto debido a la formación de puentes cruzados entre sustancias pécticas de la lámina media y el Ca, dando lugar a la estabilización de la pared celular

de la planta y a la protección frente a enzimas hidrolíticas de la pared celular, específicamente de enzimas pectolíticas como  $\beta$ -GAL y PG (White y Broadly, 2003; Serrano et al., 2002; 2004c).

Además, el tratamiento con calcio hace al fruto menos susceptible a los daños mecánicos durante el procesamiento, manipulación y envasado, como se observó en limón (Martínez-Romero et al., 1999) y ciruela (Serrano et al., 2004a). Además, tratamientos post-cosecha con infiltración de calcio en papaya y fresa, retrasaron la conversión de carbohidratos a azúcares, así como la disminución en AT, al reducir las reacciones enzimáticas de la respiración (Lara et al., 2004; Mahmud et al., 2008), mostrando un retraso en el proceso de maduración en estos frutos tratados. También se ha encontrado un efecto positivo de estos tratamientos en mejorar el aroma de manzanas tras la conservación en refrigeración (Ortiz et al., 2009).

Otros efectos beneficiosos de la infiltración de calcio sobre la calidad post-cosecha de frutos pueden estar relacionados con la función estabilizante del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las membranas celulares dando lugar a un retraso en los procesos catabólicos de proteínas de membrana y fosfolípidos y a la reducción de fuga de iones durante el almacenamiento post-cosecha de fruta (Picchioni et al., 1998). Como consecuencia se mantiene o aumenta la presión de turgencia celular que contribuye a retrasar el ablandamiento del fruto y la pérdida de peso durante el almacenamiento post-cosecha como se ha observado en papaya (Eryani-Raqeeb et al., 2009), que podría ser también atribuido al efecto del calcio sobre la disminución de la difusividad del vapor de agua a través de la estructura de la pared celular.

Además, también se ha estudiado el papel del calcio sobre la reducción de los daños por frío en mandarinas (D'Aquino et al., 2005), limones (Safizadeh et al., 2007) y melocotones (Manganaris et al., 2007), y sobre la reducción del pardeamiento, que se produce como resultado de la oxidación de los fosfolípidos de la membrana y de la polimerización de polifenoles, con especial interés en los frutos cortados, como manzanas, peras y melones (Martín-Diana et al., 2007; Alandes et al., 2009).

Los tratamientos con calcio también son efectivos controlando podredumbres post-cosecha causadas por *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Glomerella cingulata* y *Gloeosporium* en manzana y fresa, así como en papaya, siendo el efecto mayor

cuando el tratamiento con calcio se realiza mediante infiltración a vacío comparado con el de inmersión (García et al., 1996; Lara et al., 2004; Mahmud et al., 2008). Se ha observado una reducción adicional de podredumbre por combinación de tratamientos térmicos y calcio en melón cortado (Aguayo et al., 2008), mostrando que estos tratamientos combinados pueden ser una alternativa útil a los fungicidas químicos en el control de podredumbres post-cosecha. La infiltración con cloruro cálcico también fue efectiva en la reducción de la incidencia de enfermedad antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya, de manera dosis dependiente de 1,5 a 3,5 %, siendo este efecto aumentado por el tratamiento combinado quitosano-calcio (Eryani-Raqeeb et al., 2009). La reducción de podredumbres en frutos tratados con calcio se debe a la interacción entre las pectinas de la pared celular e iones de  $\text{Ca}^{+2}$  que mantiene la integridad estructural y fortalece de la pared celular, aumentando así la resistencia del tejido al ataque fúngico y a las enzimas hidrolíticas producidas por los hongos, retrasando también el ablandamiento de los frutos (Lara et al., 2004; Eryani-Raqeeb et al., 2009).

Por otra parte, tratamientos pre-cosecha con soluciones de calcio han mostrado ser efectivas retrasando la producción de etileno y el proceso de maduración en frutos climatéricos, tales como tomate (Wills et al., 1997), persimon (Agustí et al., 2004), peras (Gerasopoulos y Richardson, 1999), melocotón y nectarina (Serrano et al., 2004b) y manzanas (Recasens et al., 2004). Además, tratamientos post-cosecha con calcio pueden inhibir la producción de etileno y maduración en frutos climatéricos, tales como manzana y ciruela, siendo la producción de etileno más reducida conforme aumentan las concentraciones de calcio. Este efecto ha sido atribuido al descenso en la actividad de ACO (Serrano et al., 2004c).

Tratamientos con calcio también han sido efectivos reduciendo la producción de etileno inducida por daños mecánicos. Esta producción de etileno es la llamada producción de etileno inducible por lesión y parece ser una respuesta general de los tejidos vegetales a la lesión a través de una activación de ACS y ACO (Kato et al., 2000; Serrano et al., 2004a).

#### 1.5.4. Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son cationes orgánicas que contienen grupos amino y están presentes en todas las células eucariotas, tanto animales como vegetales. En órganos vegetales, las PAs están implicadas en el crecimiento y diferenciación de la planta así como en respuestas al estrés, siendo las PAs principales la putrescina (Put, 1,4-diaminobutano), espermidina (Spd, 1,8-diamino-4-azaoctano), y espermina (Spm, 1,12-diamino-4,9-diazadodecano). La Put es la más abundante, mientras que Spm es la más policatiónica y tiene la mayor capacidad de eliminar radicales libres y de retardar el deterioro de membranas mediante la interacción con compuestos aniónicos de las membranas y estabilización de la superficie de membrana.

La ruta biosíntesis de PA en plantas está relacionada con la ruta de biosíntesis del etileno (Kumar et al., 1997; Valero et al., 2002a), y ambas rutas comparten el precursor común SAM, aunque ejercen efectos opuestos en la maduración y senescencia del fruto, ya que niveles reducidos de PAs han sido correlacionados con incrementos en la producción de etileno, maduración del fruto y senescencia, mientras que concentraciones endógenas elevadas de PAs están asociadas con un retraso en estos procesos. Por tanto, es crucial que exista un balance entre estos dos reguladores opuestos del crecimiento para retrasar o acelerar la maduración y senescencia (Serrano et al., 1996; Pandey et al., 2000; Valero et al., 2002a; Valero y Serrano, 2010). En este sentido, varios experimentos han mostrado que aplicaciones exógenas de PAs durante el periodo de crecimiento (pre-cosecha) pueden disminuir la producción de etileno y retrasar el proceso de maduración en frutos como albaricoque (Paksasorn et al., 1995), melocotón (Bregoli et al., 2002), mango (Malik et al., 2003; Malik y Singh, 2006), nectarina (Torrighiani et al., 2004) y ciruela (Khan et al., 2008). Del mismo modo, aplicaciones post-cosecha de PAs, por inmersión o infiltración a vacío, mostraron un retraso en la maduración del fruto y extendieron la vida útil en varios frutos, incluyendo manzanas 'Golden Delicious' y 'McIntosh' (Kramer et al., 1991), mango 'Kesington Pride' (Malik y Singh, 2005), melocotón 'Babygold-6' (Martínez-Romero et al., 2000), albaricoque 'Mauricio' (Martínez-Romero et al., 2002), arándano (Basiouny, 1996), ciruelas 'Golden Japan', 'Black Diamond', 'Black Star', 'Santa Rosa' y 'Angelino' (Pérez-Vicente et al., 2002; Serrano et al., 2003; Khan et al., 2008) y granada 'Mollar de

Elche' (Mirdehghan et al., 2007a). Este efecto inhibitorio de las PAs sobre la producción de etileno puede ser atribuido tanto al mecanismo de biosíntesis competitivo entre etileno y PAs como a la inhibición de ACC sintasa y AC oxidasa.

Además, aplicaciones post-cosecha con Put ralentizaron el ablandamiento durante la maduración a temperatura ambiente de ciruela 'Angelino', siendo este efecto mayor conforme aumentó la concentración de Put de 0,1 a 2 mM (Khan et al., 2008), lo que se ha atribuido a la disminución de la actividad de enzimas biosintéticas de etileno, ACS y ACO, así como a la disminución de enzimas relacionadas con la pared celular, tales como endo- y exo-PG, EGasas y PME. Otro mecanismo implicaría la capacidad de las PAs de enlazar sustancias pécticas en la pared celular, produciendo rigidez (Valero et al., 1999; Martínez-Romero et al., 2002; Pérez-Vicente et al., 2002). Estos enlaces también bloquean el acceso de tales enzimas degradantes reduciendo la tasa de ablandamiento durante el almacenamiento (Valero et al., 2002a).

Otro efecto de la infiltración con PAs es retrasar la degradación de la clorofila en frutos como limón, melón, ciruela y albaricoque, y por tanto, el cambio de color durante el almacenamiento, que es un indicador de un retraso de la senescencia (Martínez-Romero et al., 2002; Valero et al., 1998; Lester, 2000; Khan et al., 2008).

Las PAs están también implicadas en la reducción de daños por frío debido a su capacidad para mantener la integridad de la membrana, tanto mediante la reducción de la temperatura de transición de la membrana de la fase fluida a gel como por retrasar la peroxidación lipídica, dando lugar a un aumento en la viabilidad celular, debido a su capacidad de unión de membrana y/o a sus propiedades antioxidantes. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que tratamientos con PAs exógenas después de la recolección pero antes del almacenamiento refrigerado disminuyeron los daños por frío en frutos sensibles, tales como manzana (Kramer et al., 1991), calabacín (Martínez-Téllez et al., 2002), mango (Kondo et al., 2003; Nair y Singh, 2004) y granada (Mirdehghan et al., 2007). La reducción de síntomas de daño por frío en granadas fue correlacionada con el aumento de niveles endógenos de PAs, especialmente la concentración de Spd después del tratamiento con Put. Estas evidencias sugieren una activación de la ruta de biosíntesis de PAs, con parte de la Put exógena siendo utilizada para transformarse en Spd usando S-adenosilmetionina Decarboxilasa (DCSAM),

mientras que no se produjo la conversión de Spd a Spm, ya que no se encontraron aumentos significativos en Spm (Mirdehghan et al., 2007). Asimismo, también en granadas se ha encontrado que las poliaminas retardaron el incremento en el índice de maduración (SST/acidez), así como la pérdida de peso (Pareek et al., 2015).

#### **1.5.5. 1-Metil ciclopropeno**

El 1-MCP es un potente inhibidor de la acción del etileno y es capaz de mantener la calidad post-cosecha en muchos productos hortícolas frescos (Blankenship y Dole., 2003). El 1-MCP fue aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) en 1999 para su uso en plantas ornamentales y comercializado como Ethylbloc® y bajo el nombre comercial SmartFresh™ para los productos hortícolas comestibles con derechos de uso a nivel mundial de Rohm y Haas y ahora transferidos a Agrofresh Inc, que es la empresa encargada de comercializar 1-MCP a nivel industrial en todo el mundo. En 2005, la Unión Europea aprobó el uso de 1-MCP en los Estados Miembros como regulador del crecimiento de las plantas y estableció un límite máximo de residuos (LRM) de 0,01 mg kg<sup>-1</sup>.

El 1-MCP actúa inhibiendo la percepción de etileno por los tejidos de la planta mediante la interacción con el receptor y compite con el etileno por los sitios de unión (Sisler y Serek, 1997) previniendo de este modo las respuestas etileno dependientes. Su efectividad en la inhibición de la maduración del fruto depende de la concentración de 1-MCP aplicada, hasta la saturación de los receptores, por los que tiene una afinidad 10 veces superior a la del propio etileno (Blankenship y Dole, 2003). Al bloquear la unión del etileno impide su acción hormonal, es decir, inhibe la biosíntesis autocatalítica de esta hormona y por tanto, la aceleración del proceso de maduración, por lo que éste se retrasa y las pérdidas de calidad debidas a procesos de sobre-maduración y senescencia se retrasan en el tiempo. Además, el 1-MCP también tiene efectos beneficiosos sobre los daños por frío. Se trata de un compuesto que no es tóxico a las bajas dosis necesarias para obtener efectos beneficiosos en los frutos, ya que posee una DL50 en ratas de 2,5 mg L<sup>-1</sup> (EPA, 2002). Finalmente, es necesario señalar que: 1) la temperatura a la que se realiza el tratamiento con 1-MCP afecta a su eficacia, la cual es mayor cuando el tratamiento se realiza a baja temperatura, 2) la



concentración óptima depende del fruto, aunque en general son suficientes concentraciones inferiores a 0,5 ppm, 3) el efecto del 1-MCP deja de producirse cuando se sintetizan nuevos receptores de etileno durante el periodo de conservación (Blankenship y Dole., 2003; Valero y Serrano, 2010)

Además, es interesante destacar que el porcentaje de inhibición de etileno por 1-MCP está inversamente correlacionado con el valor máximo de producción de etileno en el pico climatérico de cada fruto particular. Así, en frutos con una baja producción de etileno (como la ciruela 'Golden Japan',  $<0,5 \text{ nL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) el tratamiento con 1-MCP produjo la mayor tasa de inhibición de etileno (más del 95%). Por el contrario, en albaricoque 'Currot' que tiene una tasa de producción de etileno en el pico climatérico de  $> 40 \text{ nL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , se observó una inhibición inferior al 40%. Por tanto, se deben tener en cuenta el tipo de fruta, la variedad y la producción máxima de etileno en el pico climatérico para calcular la dosis necesaria de 1-MCP que hay que aplicar para obtener los efectos deseados (Martínez-Romero et al., 2007; Valero y Serrano, 2010).

Además, también el efecto del 1-MCP es mayor en frutos menos maduros que cuando se aplica a frutos en un estado de maduración avanzado, como ocurre en ciruelas (Valero et al., 2003) y tomates (Guillén et al., 2006; Guillén et al., 2007), así como cuando se aplica a frutos manipulados y envasados en cajas de cartón perforadas en comparación con el tratamiento de ciruelas a granel (antes de la manipulación y envasado) (Valero et al., 2004). Además, se han observado efectos positivos de la aplicación de 1-MCP sobre los daños por frío en ciruelas tanto en variedades climatéricas como en las variedades con climaterio suprimido (Candán et al., 2008).

La aplicación de 1-MCP también tiene efectos beneficiosos en varios frutos no climatéricos tales como cereza, cítricos y fresa. Así, tratamientos con 1-MCP de fresas condujeron al mantenimiento de la firmeza y color del fruto, pero incrementaron el desarrollo de enfermedades (Jiang et al., 2001). En cerezas, el 1-MCP estimuló de forma transitoria la evolución de etileno pero no tuvo impacto sobre la tasa de respiración, ablandamiento o cambios de color (Gong et al., 2002). El 1-MCP mantuvo o retrasó las pérdidas de verdor en cítricos, incluyendo naranja, mandarina y lima, lo

que es una característica deseable para una mejor comercialización (Jomori et al., 2003).

#### **1.5.6. Envasado en atmósfera modificada**

El envasado en atmósfera modificada (MAP) consiste en sellar cierta cantidad de frutas o verduras usando films plásticos con permeabilidad selectiva del O<sub>2</sub>, del CO<sub>2</sub> y del vapor de H<sub>2</sub>O, de manera que la actividad respiratoria del producto ocasiona una variación del entorno gaseoso. Los frutos y vegetales una vez recolectados siguen respirando y transpirando. La respiración de los productos aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> y disminuye la concentración de O<sub>2</sub> dentro de los envases, mientras que la tasa de transpiración aumenta la presión de agua.

La creación y mantenimiento de una atmósfera óptima dentro del envase MA depende de la tasa de respiración del producto y de la permeabilidad del film al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, estando ambos afectados por la temperatura (Kader et al., 1989; Beaudry et al., 1999). Las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> óptimas para cada fruto o vegetal darán lugar a su máxima vida de almacenamiento (Beaudry 1999; 2000; Watkins, 2000; Artés et al., 2006; Sandhya, 2009). Sin embargo, cuando el nivel de O<sub>2</sub> disminuye por debajo de su valor crítico, da lugar a la respiración anaerobia en los tejidos vegetales, teniendo efectos perjudiciales sobre la calidad del fruto. Por otro lado, cuando el nivel de CO<sub>2</sub> se eleva por encima de un valor crítico, el producto desarrolla trastornos fisiológicos.

Entre las respuestas metabólicas primarias a la baja concentración de O<sub>2</sub>, se incluye la reducción en la respiración y una disminución en la degradación de almidón y consumo de azúcar, dando lugar a la reducción de la tasa de deterioro tisular, alargando así la vida de almacenamiento del producto. Además, en frutos climatéricos como mango y papaya, también se observa un retraso en el pico de respiración (Yahia, 2006; Singh y Rao, 2005). Entre las respuestas metabólicas secundarias a la baja concentración de O<sub>2</sub>, se incluye una reducción en la biosíntesis y percepción de etileno. De hecho, bajas concentraciones de O<sub>2</sub> son conocidas por inhibir la actividad ACO, siendo este efecto dependiente de la concentración de ACC, ya que aumenta la Km de la enzima. Además, el oxígeno ejerce un efecto sobre la percepción de etileno, que se

reduce a medida que disminuye la concentración de O<sub>2</sub>. Por lo tanto, en frutos climatéricos, las concentraciones de O<sub>2</sub> no son lo suficientemente bajas como para reducir la tasa de respiración, pero reducen la tasa de maduración a través de un efecto mediado por el etileno (Abeles et al., 1992). Por otro lado, el CO<sub>2</sub> es un antagonista de la acción del etileno que impide su síntesis autocatalítica. De hecho, niveles de CO<sub>2</sub> mayores del 1 % disminuyen o inhiben la biosíntesis de etileno y por tanto, retardan la maduración y deterioro del fruto, siendo estos efectos añadidos a aquellos que se producen en atmósferas de O<sub>2</sub> reducidas (Artés et al., 2006).

La modificación en la concentración de gases en el interior de un envase MAP da lugar a la reducción de la pérdida de peso, la tasa de respiración y la producción de etileno, así como al retardo de propiedades relacionadas con el proceso de maduración, y a su vez, permite mantener la calidad post-cosecha durante largos periodos (Alam et al., 2006; Artés et al., 2006; Valero y Serrano, 2010). Así, el MAP retrasa la maduración y senescencia en distintos frutos incluidas manzanas (Moodley et al., 2002), uvas de mesa (Martínez-Romero et al., 2003b; Artés-Hernández et al., 2006), cerezas (Remón et al., 2000; Petracek et al., 2002; Kappel et al., 2002; Spots et al., 2002; Tian et al., 2004; Serrano et al., 2005b; Wani et al., 2014), níspero (Amorós et al., 2008), litchi (Sivakumar y Korsten, 2006), papaya (González-Aguilar et al., 2003), fresas y frambuesas (Lange, 2000; Nielsen y Leufvén, 2008) y ciruelas (Díaz-Mula et al., 2011), entre otros.

Las pérdidas de peso debidas a la tasa de transpiración se ven reducidas con el uso de MAP puesto que los films usados tienen pequeña difusión al vapor de agua y la atmósfera interna del envase adquiere una presión de vapor de agua cerca de la saturación, disminuyendo así la transpiración de los tejidos vegetales y por consiguiente, las pérdidas de peso. Se obtuvieron reducciones en las pérdidas de peso en distintos frutos envasados en MAP como brócoli (Serrano et al., 2006), níspero (Amorós et al., 2008), uvas de mesa (Martínez-Romero et al., 2003b), nectarinas (Retamales et al., 2000), melocotones (Akbudak y Eris, 2004) y cerezas (Kappel et al., 2002; Serrano et al., 2005b; Wani et al., 2014) y ciruelas (Díaz-Mula et al., 2011).

En la evolución del color de frutos almacenados bajo condiciones MAP se produce un retraso asociado con el proceso de maduración post-cosecha, como se ha

observado en mango (Pesis et al., 2002), uva de mesa (Martínez-Romero et al., 2003b), níspero (Amorós et al., 2008), brócoli (Serrano et al., 2006) y ciruelas (Díaz-Mula et al., 2011). Además, en cerezas mantiene el color y su intensidad (brillo), y mantiene el color verde de los pedúnculos (Wargo et al., 2003; Tian et al., 2004; Serrano et al., 2005b; Kahlke et al., 2009;). La conservación del color puede ser atribuida a que bajas concentraciones de O<sub>2</sub> reducen la degradación de clorofilas y el pardeamiento inhibiendo a la enzima feoforbida oxigenasa y PPO (Beaudry, 2000), o por el retraso en la biosíntesis de carotenoides y antocianinas (Artés et al., 2006).

El MAP es también efectivo retrasando el ablandamiento y retrasando el aumento del índice de maduración en una amplia gama de frutos, como fresas (García et al., 1998), albaricoque (Pretel et al., 1993; 1999), kiwi (Agar et al., 1999), níspero (Amorós et al., 2008), melocotones y nectarinas (Akbulak y Eris, 2004), uvas de mesa (Martínez-Romero et al., 2003b) y ciruelas (Díaz-Mula et al., 2011). Por otro lado, también se ha mostrado su efectividad en la reducción de podredumbres en algunos frutos como melocotones y nectarinas (Akbulak y Eris, 2004) y cerezas (Tian et al., 2001; Spots et al., 2002; Wani et al., 2014). Los beneficios del uso de MAP son mayores en frutos tropicales ya que reducen la sensibilidad al frío (Yahia, 2006; Sandhya, 2010). Así, la aparición de daños por frío disminuyó en papaya (Singh y Rao, 2005), en pimiento (Serrano et al., 1997), en melocotones (Hodges et al., 2004) y en ciruelas 'Friar' (Cantín et al., 2008; Guan y Dou, 2010).

Los niveles de CO<sub>2</sub> del MAP en cerezas no parecen influir en la tasa de respiración o de producción de etanol o acetaldehído (Jaime et al., 2001; Petracek et al., 2002). Sin embargo, concentraciones de CO<sub>2</sub> mayores del 30% son asociadas con decoloraciones marrones en la piel y malos sabores. La solubilidad del CO<sub>2</sub> disminuye drásticamente con el aumento de temperatura, por lo tanto, la temperatura de almacenamiento del producto debe mantenerse tan baja como sea posible, y debe encontrarse la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> óptima para evitar pérdidas de calidad (Padilla-Zakour et al., 2007; Conte et al., 2009).

El aumento del contenido total de antocianinas que se produce en las cerezas se retrasa ligeramente con el MAP durante el almacenamiento (Remón et al., 2000; Padilla-Zakour et al., 2007; Conte et al., 2009). Este efecto puede ser debido a que las

concentraciones de CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza pueden inhibir la actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la glucosiltransferasa (GT), favoreciendo la estabilidad del color durante el almacenamiento (Rocha et al., 2001; Remón et al., 2004).

#### **1.5.7. Recubrimientos comestibles**

Los recubrimientos comestibles pueden ser definidos como una capa delgada de material que cubre la superficie del alimento y puede consumirse como parte del producto entero. La aplicación de un recubrimiento comestible sobre la superficie del fruto modifica la atmósfera interna de la misma manera que hace el film de plástico, mediante el incremento de la concentración de dióxido de carbono y disminución de oxígeno. El éxito de los recubrimientos comestibles para frutos depende principalmente de la composición del recubrimiento, de manera que pueda proporcionar una composición gaseosa interna deseable que sea apropiada para un producto específico. Además, si un recubrimiento es demasiado grueso puede producir efectos perjudiciales debido a una concentración interna de oxígeno por debajo de un nivel deseable y beneficioso y un aumento asociado de la concentración de dióxido de carbono por encima de un nivel crítico tolerable. Con carácter general, la permeabilidad del oxígeno de la mayoría de recubrimientos comestibles es menor que la de los films de plástico convencionales (Park, 1999). De acuerdo con las Directivas Europeas (ED, 1995; 1998) y el Código de Regulaciones Federales de EE.UU (FDA, 2006) los recubrimientos comestibles deben ser formulados con aditivos de grado alimentario, y la cantidad de ingredientes usados debe ser sólo la necesaria para cumplir el efecto previsto, y los ingredientes deben ser GRAS y estar listados en el código anteriormente citado.

El recubrimiento a base de biopolímeros se define como embalaje que contiene materias primas procedentes de fuentes agrarias y marinas. Hay tres biopolímeros de estas categorías: a) extraídos directamente de materias primas naturales, tales como almidón, celulosa, proteínas y procariotas marinos, b) producido por síntesis química a partir de monómeros bioderivados, y c) producida por microorganismos tales como hidroxibutirato y hidroxivalerato (Cha y Chinnan, 2004). Los componentes de films o

recubrimientos comestibles pueden ser divididos en tres categorías: hidrocoloidales, lípidos y compuestos. Los hidrocoloidales incluyen proteínas del suero de la leche, como caseína, y zeína, y polisacáridos, tales como almidón, alginato, derivados de celulosa, quitosano y agar. Los lípidos incluyen ceras, acilgliceroles y ácidos grasos. Los compuestos contienen tanto componentes hidrocoloidales como lipídicos. La elección de materiales para un film o recubrimiento depende en gran medida de la función deseada (Srinivasa y Tharanathan, 2007; Acevedo et al., 2012).

Tradicionalmente, los recubrimientos comestibles han sido usados como una barrera para minimizar las pérdidas de agua y retrasar la senescencia natural de frutos recubiertos mediante la permeabilidad selectiva a los gases. Sin embargo, la nueva generación de recubrimientos comestibles está siendo especialmente designada para permitir la incorporación y/o liberación controlada de antioxidantes, vitaminas, nutraceuticos, y agentes antimicrobianos naturales por medio de la aplicación de tecnologías prometedoras como nano encapsulación y capa por capa (Vargas et al., 2008).

Los recubrimientos comestibles a base de alginato han sido efectivos en el retraso de la maduración y el mantenimiento de la calidad post-cosecha en varios frutos como tomate (Zapata et al., 2008), y melocotón (Maftoonazad et al., 2008). Además, tratamientos de tomates con alginato junto con aceites esenciales fueron más efectivos en la reducción de los procesos de maduración que con alginato solo (Zapata et al., 2010). Del mismo modo, los tratamientos con alginato también mostraron ser una herramienta efectiva en el retraso del proceso de maduración post-cosecha manifestado por una reducción de cambios de color, pérdidas de acidez y firmeza y tasa de respiración, así como por su efecto positivo en el mantenimiento de una mayor concentración de fenoles totales y ATT en cerezas (Díaz-Mula et al., 2012) y ciruelas (Valero et al., 2013).

Asimismo, tomates recubiertos con alginato o zeína mostraron menor tasa de respiración y producción de etileno que los tomates control, con una concentración dos veces menor del precursor de etileno. Además, la evolución de los parámetros relacionados con pérdidas de calidad de tomate, tales como ablandamiento, evolución del color y pérdida de peso se retrasó significativamente (4-6 días de media) en los

tomates recubiertos en comparación con los controles. La concentración de azúcares, ácidos orgánicos (especialmente el ácido ascórbico) y las calificaciones del análisis sensorial se mantuvieron en niveles mucho más altos al final del almacenamiento en tomates tratados que en los control (Zapata et al., 2008).

En los últimos años, los esfuerzos de investigación se han centrado en el diseño de nuevos recubrimientos ecológicos a base de polímeros biodegradables, que no sólo reducen los requisitos de embalaje, sino que también conducen a la conversión de los subproductos de la industria alimentaria en el valor añadido de los componentes formadores de films. Entre estos nuevos materiales para los recubrimientos comestibles se encuentra el gel de *Aloe vera*, que está compuesto principalmente de polisacáridos y azúcares solubles seguidos por proteínas, vitaminas y minerales (Eshun y He, 2004), pero tienen un contenido bajo en lípidos, variando entre 0,07 y 0,42% dependiendo de la especie de *Aloe* y de las condiciones climáticas durante su ciclo de crecimiento (Zapata et al., 2013). El gel de *Aloe vera* fue el primero que se usó en uva de mesa (Valverde et al., 2005) y cereza (Martínez-Romero et al., 2006) obteniéndose resultados satisfactorios en términos de disminuir la pérdida de peso y la tasa de respiración durante el almacenamiento post-recolección. Además, el gel de *A. vera* retrasó los cambios de color, ablandamiento y pérdidas de AT, manteniendo la calidad del fruto junto con una reducción del recuento de aeróbios mesófilos y mohos y levaduras sin afectar las propiedades sensoriales de los frutos. Asimismo, se obtuvieron raquis con mejor frescura, sin síntomas de pardeamiento y con menor incidencia de podredumbre después de 35 días de almacenamiento refrigerado (Castillo et al., 2010). Además, la adición de rosa mosqueta junto con *A. vera* inhibió la producción de etileno en mayor medida que el gel *A. vera sólo*, mejorando los efectos beneficiosos del gel debido al retraso de la maduración y mantenimiento de la calidad post-cosecha de diversos frutos de hueso tales como melocotón, nectarina, ciruela y cereza (Paladines et al., 2014).

## 1.6 DERIVADOS DE SALICILATOS: ÁCIDO SALICÍLICO, ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO Y SALICILATO DE METILO

Existen diversos tratamientos post-cosecha con efectos beneficiosos para los productos vegetales frescos que afectan a los procesos de maduración y su fisiología, como se ha comentado en el apartado anterior 1.5. Los consumidores, cada vez más, demandan métodos de conservación de alimentos con ausencia de residuos químicos o pesticidas, y por tanto, existe un creciente interés en el uso de compuestos naturales. Estudios recientes han mostrado que el uso de moléculas señal, tales como los salicilatos, pueden ser introducidos como potentes alternativos a los químicos.

El ácido salicílico o ácido 2-hidroxibenzoico (AS) y otros compuestos relacionados, los salicilatos, han sido utilizados en medicina desde la antigüedad. En 1828 Johann Buchner aisló por primera vez una pequeña cantidad de salicina, y fue en 1838 cuando Raffaele Piria llamó a este compuesto ácido salicílico, nombre derivado de la palabra latina *Salix*, el árbol de cuya corteza fue aislado por primera vez, corteza que se usaba para curar la fiebre de los pantanos. En 1874 se inició la producción comercial de AS en Alemania (Raskin, 1992a; b), mientras que la Aspirina (ácido acetyl salicílico), un análogo cercano al AS, fue introducida por “Bayer Company” en 1898, convirtiéndose en el primer medicamento anti-inflamatorio más extensamente usado durante años.

El AS es un regulador endógeno del crecimiento de las plantas de naturaleza fenólica que posee un anillo aromático con un grupo hidróxilo o un derivado funcional. Ya fue al principio de los años 90, cuando un estudio exhaustivo en hojas y estructuras reproductivas de diferentes especies, confirmó la distribución ubicua del AS en el reino vegetal y fue cuantificado en 36 plantas pertenecientes a diversos grupos (Raskin et al., 1990).

A principios de 1960, se sugirió que el ácido salicílico en plantas se sintetizaba a partir del ácido cinámico por dos posibles rutas biosintéticas. Una vía implica la descarboxilación de la cadena lateral de ácido cinámico para formar ácido benzoico, que a su vez sufre 2 hidroxilaciones para formar ácido salicílico, como se publicó para



la planta del tabaco y el arroz. La otra vía propuesta invierte los pasos e implica 2 hidroxilaciones de ácido cinámico a ácido o-cumárico que después se descarboxila dando lugar a ácido salicílico. Dos enzimas clave están involucradas en la síntesis y metabolismo del AS: ácido benzoico 2-hidrolasa, que convierte el ácido benzoico en AS, y AS-glucosiltransferasa, que cataliza la conversión de AS hasta AS-glucósido (Yalpani et al., 1993; Silverman et al., 1995).

Estudios más recientes han propuesto otra ruta (Figura 9), la del ácido siquímico, basándose en estudios realizados en *Arabidopsis*. Se han propuesto dos caminos de síntesis a partir del corismato, un producto de la vía del ácido siquímico. Una ruta es a través del isocorismato sintasa (ICS) en los cloroplastos, la cual se cree que es responsable de más del 90 % del AS sintetizado durante la activación de las respuestas de estrés y es responsable de proporcionar resistencia local y RSA (Wildermuth, et al., 2001). La otra ruta está mediada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en el citoplasma que convierte la fenilalanina en ácido cinámico, que se transforma en ácido benzoico o ácido o-cumárico, que son los precursores de AS (Sharon-Asa, 2003).

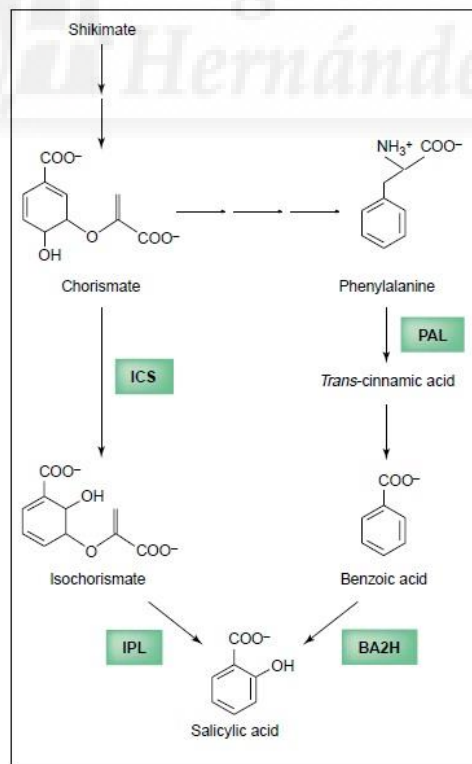


Fig. 9. Ruta metabólica propuesta para la biosíntesis de AS en plantas. Reproducido de (Sharon-Asa, 2003).

El AS tiene la propiedad de formar conjugados con diversas moléculas por diferentes vías: glucosilación o esterificación (Popova et al., 1997), metilación, conjugación de aminoácidos, sulfonación, hidroxilación, etc., pero la mayoría de ellos no son compuestos activos. La mayoría del AS sintetizado se convierte y es almacenado como derivados biológicamente inactivos ya que la acumulación de AS tiene consecuencias fisiológicas adversas (Heidel et al., 2004). La mayoría del AS producido en las plantas es glucosilado (SAG) y se cree que es la principal forma de almacenamiento con el potencial de ser convertido de nuevo en AS mediante reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima AS  $\beta$ -glucosidasa (Lee et al., 1998; 1999).

Las primeras evidencias del papel hormonal del AS como se deben a Cleland y Ajami (1974) quienes descubrieron su capacidad de inducir la floración en *Lemna gibba* G3 y *Xanthium strumarium* L. Posteriormente, se descubrió que el AAS en plantas de tabaco, aumentaba su resistencia contra el virus del mosaico del tabaco (White et al., 1979; Antoniow, 1980). Además, se observó un efecto inhibitorio en la biosíntesis de etileno en láminas del mesocarpo de manzana (Romani et al., 1989) y en cultivos celulares de peras, mediante el bloqueo de la conversión de ACC a etileno (Leslie y Romani, 1986). El AS ha sido descrito como un compuesto efectivo, no tóxico e inhibidor reversible de la biosíntesis de etileno a concentraciones comparables con aquellas encontradas en algunos tejidos vegetales (Raskin 1992b).

Así pues, desde el año 1992, el **ácido salicílico** (AS) se considera una potente hormona vegetal (Raskin et al., 1992a), que juega un papel importante en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos durante el crecimiento y desarrollo de la planta, en la interacción de la planta con otros microorganismos y en su respuesta a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Raskin, 1992a, b; Yalpani et al., 1994; Popova et al., 1997; Senaratna et al., 2000). Entre sus efectos fisiológicos destacan estimular la germinación de semillas, el crecimiento del fruto, la glicólisis, la floración en plantas termogénicas (Klessing y Malamy, 1994), la captación y transporte de iones (Harper y Balke, 1981), la tasa fotosintética, la conductancia estomática y la transpiración (Khan et al., 2003). No obstante, el efecto más característico del AS es la inducción de la resistencia sistémica adquirida (RSA), que participa en la resistencia a

enfermedades locales y endémicas en las plantas, activando los sistemas de defensa en los tejidos infectados. Además el AS sintetizado como respuesta a la infección se transporta por el floema a otras partes sanas de la planta y en ellas también estimula los sistemas de defensa, protegiendo así a toda la planta de futuras infecciones después del ataque patógeno inicial (Enyedi et al., 1992; Alvarez, 2000; Beckers et al., 2006). Por otro lado, el AS modula la respuesta de las plantas frente a varios tipos de estrés abiótico, tales como luz UV, sequía, salinidad, daños mecánicos, estrés por frío y shock térmico (Ding et al., 2001; Ding y Wang, 2003).

El **ácido acetil salicílico** (AAS), es un análogo al ácido salicílico, en el que se transforma espontáneamente al hidrolizarse. Por otro lado, el **salicilato de metilo** (SaMe) es un derivado metilado, que es también una forma inactiva pero al ser volátil, puede fácilmente difundir a través de las membranas y actúa como una molécula señal volátil a larga distancia. Así, el salicilato de metilo (SaMe) se sintetiza como respuesta a una infección por patógenos y se transporta en estado gaseoso hacia tejidos sanos de esa misma planta o incluso de plantas vecinas, y en esos tejidos desarrolla el sistema de defensa RSA, de manera que esos tejidos sanos de la planta infectada o las plantas vecinas pueden resistir y combatir la futura infección. (Hayat et al., 2010).

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el uso de salicilatos como tratamientos post-cosecha, debido a su potencial para reducir daños por frío, como “pitting”, decoloración y susceptibilidad a las podredumbres, permitiendo así extender la vida útil de productos vegetales. Así pues, tratamientos post-cosecha con AS redujeron los daños por frío en tomate (Ding et al., 2002), plátano (Kang et al., 2003), ciruela (Luo et al., 2011) y granada (Sayyari et al., 2009).

El tratamiento de granadas con AAS también redujo los daños por frío y mantuvo los compuestos bioactivos y actividad antioxidante (Sayyari et al., 2011b). En otros frutos tales como melocotón, los tratamientos con AS redujeron el deterioro del fruto controlando la pérdida de electrolitos de la membrana celular, disminuyeron la respiración y producción de etileno, aumentaron el contenido de malondialdehído, mantuvieron la firmeza de la pulpa, y aumentaron la actividad de enzimas antioxidantes (Han et al., 2003). Del mismo modo, la aplicación de AS aumentó la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y POD) y disminuyó PPO, manteniendo

la calidad de melocotón durante el almacenamiento (Tareen et al., 2012), y aumentó la actividad antioxidante, compuestos bioactivos y sistema antioxidante en albaricoque (Wang et al., 2015).

Concretamente, en cereza los tratamientos post-cosecha con AS o AAS a 1 mM retrasaron el proceso de maduración y aumentaron los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante (Valero et al., 2011). La aplicación exógena de AAS disminuyó los síntomas de daño por frío, inhibió la acumulación de radicales libres superóxido y redujo la actividad de las enzimas CAT, PAL, CAD y G-POD (Cai et al., 2006), e inhibió la síntesis de etileno, maduración del fruto, acumulación de ACC y aumentó la actividad de ACS y ACO en kiwi (Yin et al., 2013).

Se observó un comportamiento similar cuando se aplicaron tratamientos post-cosecha con SaMe, que redujeron los daños por frío, mejoraron la vida útil y aumentaron la capacidad antioxidante, y disminuyeron la incidencia de ataque fúngico en tomates cherry (Zhang et al., 2011), en granadas almacenadas (Sayyari et al., 2011a), y en mangos y tomates (Glowacz y Rees, 2015).

Por tanto, tratamientos post-cosecha con salicilatos pueden ser herramientas prometedoras e innovadoras para extender la vida útil de los frutos, aumentando su capacidad para resistir a los distintos tipos de estrés post-cosecha, mediante la aceleración de la respuesta de ataque por patógenos fúngicos, e incrementando su resistencia a los daños por frío. Las respuestas positivas están a veces asociadas con el aumento de la actividad de enzimas de defensa e incremento en el contenido de compuestos bioactivos. Sin embargo, las respuestas parecen ser específicas del fruto y variedad, y también dependen de otros factores, tales como el estado de desarrollo del fruto, dosis del tratamiento y condiciones de almacenamiento.

Por el contrario, existe poca información sobre el uso de salicilatos en pre-cosecha, y los existentes se enfocaron a analizar el efecto de estos tratamientos en la inducción de los sistemas de defensa frente al ataque fúngico. Así, tratamientos pre-cosecha con AS 2 mM redujeron significativamente el diámetro de lesión en cerezas causada por *Monilia fructicola* y aumentó la actividad de las enzimas  $\beta$ -1,3- glucanasa, PAL y POD durante los primeros días de almacenamiento, siendo mayor la eficacia de los tratamientos pre-cosecha que la de los tratamientos post-cosecha (Yao et al.,

2005). Tratamientos con AS también redujeron la podredumbre fúngica en fresa, con un efecto adicional manteniendo la calidad general durante la conservación, y se obtuvieron mejores resultados cuando se combinaron tratamientos pre- con post-cosecha (Babalar et al., 2007). Además, aplicaciones de AS en naranja, incrementaron el contenido de carotenoides, ácido ascórbico, glutatión, fenoles y flavonoides totales en la piel y la pulpa durante el almacenamiento (Huang et al., 2008).

Sin embargo, en las cerezas no existe información del efecto de estos tratamientos con salicilatos, aplicados durante la fase de desarrollo del fruto en el árbol, en las características de calidad de las cerezas, tanto en el momento de la recolección, como en su conservación post-recolección, lo cual será el objetivo fundamental de esta Tesis.





## Capítulo 2. Objetivos

---







## 2. OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes expuestos en la introducción, el **objetivo general** de esta Tesis es evaluar el efecto de los tratamientos de cerezos con ácido salicílico (AS) y sus derivados ácido acetil salicílico (AAS) y salicilato de metilo (SaMe), aplicados mediante spray foliar, sobre diferentes parámetros relacionados con la calidad del fruto. Este objetivo es novedoso, ya que hoy en día no existe conocimiento del efecto de estos tratamientos aplicados en pre-cosecha y tan sólo hay algunas evidencias de estos tratamientos aplicados en post-recolección.

Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes **objetivos parciales**:

1) Determinar **la concentración más efectiva** de AS, AAS y SaMe sobre la calidad de la cereza en el momento de la recolección, así como su efecto en la evolución del proceso de maduración en el árbol de este fruto. Para la consecución de este objetivo se aplicarán tres concentraciones de estos compuestos, 0,5, 1 y 2 mM, en tres momentos claves del desarrollo de la cereza en el árbol (endurecimiento del hueso, inicio de los cambios de color y una semana antes de la recolección), a dos variedades de cereza, 'SweetHeart' y 'Sweet Late', cultivadas en una finca comercial en Jumilla.

El efecto de estos tratamientos se determinará mediante el análisis de parámetros fisiológicos, como tasa de respiración y producción de etileno, parámetros relacionados con la calidad organoléptica, como tamaño del fruto, color, firmeza y análisis sensorial, con la calidad nutritiva, sólidos solubles totales y acidez total y con la calidad funcional, mediante el análisis del contenido en fenoles totales, antocianinas totales y carotenoides totales así como de la actividad antioxidante total (hidrosoluble y liposoluble). Asimismo se analizará el efecto de los tratamientos en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD), por su implicación en la eliminación de los radicales libres de oxígeno, implicados en el proceso de maduración y senescencia de los frutos.

2) Determinar **el efecto de estos tratamientos sobre la evolución de los parámetros de calidad de las cerezas durante el almacenamiento** post-recolección bajo condiciones de refrigeración. Para abordar este objetivo se seleccionará la concentración más efectiva de estos compuestos, según los resultados obtenidos en el primer objetivo, y la evolución de la calidad de estas cerezas tratadas durante la conservación post-recolección se comparará con la de cerezas procedentes de árboles controles no tratados. Este estudio se realizará con las dos variedades usadas en el Objetivo número uno y con una variedad adicional, la 'Lapins', cultivada en una finca comercial en el interior de Alicante y los parámetros de calidad a analizar serán los mismos que se han comentado anteriormente.

Los resultados esperables, de acuerdo con los antecedentes expuestos en la introducción, serán obtener frutos con mayor calidad y con mayor contenido en compuestos antioxidantes, lo que supondrá un beneficio para la salud de los consumidores, dado la relación existente entre el consumo de frutos con elevado contenido en antioxidantes y la disminución del riesgo de varias enfermedades degenerativas. Así mismo, es necesario destacar que estos compuestos son naturales, considerados como GRAS y por tanto satisfacen la demanda de los consumidores hacia el uso de estrategias de producción y conservación inocuas para la salud y tecnologías más respetuosas con el medio ambiente.

# **Capítulo 3. Materiales y Métodos**

---

*Miguel  
Hernández*



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos pre-cosecha se realizaron en dos años consecutivos, en el periodo primavera-verano de 2013 y 2014.

En **2013**, se usaron dos variedades de cerezas, 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', cultivadas en una explotación comercial de "Fincas Toli S.L" localizada en Jumilla (38.473800 N, -1.323861 O, Murcia, España). Se seleccionaron dos filas separadas, una para cada variedad, y se seleccionaron 30 árboles de cada variedad según un diseño completamente aleatorizado. Se seleccionaron tres árboles completamente al azar para cada variedad y tratamiento: control (agua destilada), ácido salicílico (AS), ácido acetil salicílico (AAS) y salicilato de metilo (SaMe) a tres concentraciones (0,5, 1 y 2 mM). Los dos primeros y dos últimos árboles de cada fila se consideraron árboles guardia y cada grupo de los árboles tratados se separó por dos árboles sin tratar para evitar contaminación cruzada. Ambas variedades mostraron el mismo día de la plena floración (20 de Febrero) pero las fechas de recolección comercial fueron 8 de Julio (138 días después de la plena floración, DDPF) y 16 de Julio (145 DDPF) para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' respectivamente.

Los tratamientos AS, AAS y SaMe recién preparados (contenían además un 0,5 % de Tween 20) se aplicaron mediante pulverización foliar con un pulverizador mecánico (7,5 L/árbol, que fue suficiente para humedecer toda la copa del árbol), y fueron repetidos en 3 fechas clave del ciclo de crecimiento: T1 (lignificación del hueso, 98 días después de la plena floración (DDPF), T2 (cambios de color iniciales, 112 DDPF) y T3 (inicio de la maduración, 126 DDPF). Estas fechas correspondían con puntos clave en el proceso de desarrollo del fruto, de acuerdo con experimentos previos (Díaz-Mula et al., 2009).

Una semana antes del tratamiento T1, se etiquetaron 20 frutos de cada árbol alrededor del perímetro ecuatorial, en el que se siguió el crecimiento del fruto a través

de la medida del diámetro polar, ecuatorial y de sutura, para seguir su crecimiento y se calculó el volumen del fruto según estudios previos (Díaz-Mula et al., 2009).

Semanalmente, desde una semana antes del tratamiento T1 hasta la recolección comercial, se recolectaron 20 frutos (similares a aquellos etiquetados previamente) para cada árbol (o réplica) para realizar posteriores determinaciones analíticas: peso del fruto, firmeza, color, SST, AT y tasa de respiración. Todas las cerezas fueron recolectadas en el estado de madurez comercial, de acuerdo con el técnico de campo de la finca y basándose en las características propias de cada variedad (tamaño, color y contenido en SST), usando la escala de color CTIFL para el color visual. La escala de color CTIFL es una carta de color estándar del “Centre Technique Interprofessionnel de Fruits et Légumes” que oscila entre 1 (rojo claro) y 7 (negro), y dependiendo de la variedad se recolectará en un estado u otro.

En el momento de la recolección, se cogieron manualmente de forma aleatoria 100 frutos para cada variedad, árbol y tratamiento en los que se determinaron el peso y tamaño y se realizó el análisis sensorial. Además, se cogieron unos 3 kg de cerezas de cada uno de los tratamientos e inmediatamente se transportaron al laboratorio para realizar los experimentos de **almacenamiento post-cosecha**. Se seleccionaron al azar 15 lotes de 20 frutos cada uno para cada tratamiento y variedad (sin defectos visuales y homogéneos en tamaño y color), se pesaron y almacenaron a 2 °C durante 0, 7, 14, 21 y 28 días y HR del 85 % + 1 día a 20 °C y HR del 70 %.

Para cada fecha de muestreo, se tomaron 3 lotes al azar para realizar las siguientes determinaciones analíticas: peso, color (croma), firmeza, contenido en sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT). Además, se determinó el contenido en compuestos bioactivos (fenoles totales, antocianinas totales y carotenoides totales), actividad antioxidante total (tanto en la fracción hidrosoluble como liposoluble) y actividad de las enzimas SOD, CAT, POD y APX. Estas determinaciones se realizaron en frutos control y en aquellos de los árboles tratados con AS 0,5 mM, AAS 1 mM y SaMe 1mM, ya que fue con estas concentraciones con las que se obtuvieron los mejores resultados sobre los parámetros de calidad del fruto. Para ello, se cortó en pequeñas piezas, la porción comestible del fruto para cada lote para obtener una muestra

homogénea, se congeló en N<sub>2</sub> líquido, se mezcló y se almacenó a -20 °C para realizar las posteriores determinaciones por duplicado de cada una de las muestras

En **2014**, además de las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' cultivadas en "Fincas Toli S.L", se usó una variedad adicional 'Lapins', cultivada en una explotación comercial "Cerezas Aitana" localizada en Alcoy (38.780634 N, -0.443124 O, Alicante, España). Ambos lugares presentan unas condiciones ambientales y climáticas similares, y los cerezos se cultivaron con prácticas de cultivo similares. Todas las variedades fueron injertadas sobre un patrón 'Santa Lucía 64' y en un marco de plantación de 3 x 4 m.

Para realizar los tratamientos pre-cosecha en 2014, se seleccionaron al azar 10 árboles (réplicas) de cada variedad para cada uno de los tratamientos siguientes: control (agua destilada), AS 0,5 mM, AAS 1 mM y SaMe 1mM, ya que estas fueron las concentraciones con las que previamente se obtuvieron los mejores resultados en los experimentos de 2013. Los dos primeros y dos últimos árboles de cada fila fueron considerados árboles guardia y cada uno de los árboles tratados fue separado por dos árboles sin tratar para evitar contaminación cruzada. Los tratamientos fueron aplicados del mismo modo y repetido en las mismas fechas que en 2013 (T1, T2 y T3).

Todas las cerezas fueron recolectadas en el estado de madurez comercial, de acuerdo con el técnico de campo de la finca y basándose en las características propias de cada variedad (tamaño, color y contenido en SST), usando la escala de color CTIFL para el color visual que fue 5 para la variedad 'Lapins' y 4 para las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', de acuerdo con investigaciones previas (Díaz-Mula et al., 2009). En el momento de la recolección, se registró la producción total de fruta, de cada uno de los 10 árboles tratados o los controles, y la producción fue expresada como kilogramo por árbol. De cada árbol, se tomaron al azar 3 lotes de 100 frutos y se usaron para calcular el peso del fruto en la recolección.

Se seleccionaron 300 frutos, homogéneos en color y tamaño y sin defectos visuales, para cada variedad de árboles control y tratados con AS 0,5 mM, AAS 1 mM y SaMe 1mM y agrupados al azar en 15 lotes de 20 frutos para cada tratamiento, los

cuales fueron almacenados en una cámara de refrigeración en atmósfera normal a 2 °C y HR del 85 % para realizar el experimento de almacenamiento como en el experimento de 2013. Se tomó un lote al azar para cada réplica después de 0, 14 y 28 días de almacenamiento refrigerado y se mantuvo durante 1 día a 20 °C y HR del 70 %, después del cual se realizaron las determinaciones analíticas.

## 3.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### 3.2.1. Tasa de respiración

Para determinar la tasa de respiración se utilizó el sistema estático propuesto por Kader (1992) que implica encerrar el producto en un recipiente de cierre hermético por un periodo de tiempo. Para realizar estas medidas se introdujeron 20 frutos de cada réplica, de peso conocido, en frascos de vidrio de 500 mL de capacidad con tapadera de cierre hermético. Esta tapadera constaba de un septum, válvula de material elastómero, que permitió, transcurridos 30 minutos, tomar una muestra del aire de cabeza de los botes con jeringas de 1 mL cada una.

La tasa de producción de CO<sub>2</sub> se cuantificó usando un cromatógrafo de gases Shimadzu<sup>TM</sup> GC-14B con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna de relleno concéntrica CTR I (ALLTECH), con las siguientes condiciones de trabajo: temperatura del horno de 35 °C, temperatura del inyector de 120 °C, temperatura del detector de 120 °C y flujo del gas portador (Helio) de 65 mL/min. Se realizó una calibración con patrón externo usando aire atmosférico, cuya concentración de CO<sub>2</sub> es 0,036 %. El cromatógrafo estaba conectado a un ordenador personal con un programa informático específico para el registro de los cromatogramas y su integración que permite la cuantificación.

El CO<sub>2</sub> producido como consecuencia del metabolismo se acumula y puede calcularse conociendo el peso del producto, el volumen del recipiente, y el tiempo que permanece cerrado el envase. La concentración de CO<sub>2</sub> en las muestras tomadas de los frascos, se calculó comparando el área de integración del pico de la muestra con la de



los patrones utilizados de concentración conocida. Los resultados para la tasa de respiración fueron la media  $\pm$  ES y se expresaron como  $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### 3.2.2. Pérdida de peso

El peso se determinó mediante una balanza Radwag WLC 2/A2 (Radwag Wagi Elektroniczne) con 2 cifras decimales de precisión y se expresó en gramos. Se pesaron los frutos cada día de muestreo y se compararon con los pesos que poseían el día 0. La determinación de pérdida de peso se expresó en % con respecto al peso inicial y los resultados son la media  $\pm$  ES de los tres lotes.

### 3.2.3. Color

La medida de color se determinó en la superficie de cada cara de los 20 frutos para cada réplica, usando un colorímetro Minolta (CRC 200, Minolta Camera Co., Japón), usando las coordenadas CIELab y expresando los resultados como el índice  $a^*/b^*$ , el índice croma ( $\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$ ) o el ángulo Hue ( $\arctg(b^*/a^*)$ ). Los datos son el resultado de la media  $\pm$  ES de 60 frutos.

### 3.2.4. Textura

La firmeza se determinó independientemente en 20 frutos de cada réplica usando un Texturómetro TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, UK) conectado con un ordenador personal. Se realizó un ensayo de deformación del fruto con un plato plano de acero montado sobre el texturómetro. Este disco de acero se hace descender hasta que contacta con la superficie del fruto y el equipo mide el diámetro del mismo. A continuación continua el descenso del disco y se aplica una fuerza hasta alcanzar una deformación del 3 % del diámetro del fruto. Los resultados se expresaron como la relación fuerza-deformación ( $\text{N mm}^{-1}$ ) y fueron la media  $\pm$  ES.

### 3.2.5. Homogeneización de muestras

Tras medir la textura de los 20 frutos de cada muestra se cortaron en trozos pequeños para obtener una muestra homogénea de cada réplica. Parte de la muestra fue utilizada para realizar las determinaciones de SST y acidez total y el resto se guardó en bolsas en el congelador (-20 °C) correctamente identificadas por variedad, tratamiento y fecha de muestreo.

### 3.2.6. Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales (SST) se midieron por duplicado sobre el zumo obtenido de 5 g de cada muestra mediante refractometría. Para ello se utilizó un refractómetro digital Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japón) a 20 °C, y se expresaron como g 100 g<sup>-1</sup> (media ± ES).

### 3.2.7. Acidez titulable

La acidez total (AT) se determinó por duplicado en el mismo zumo mediante titulación automática con un pH metro 785 DMP Titrino (Metrohm) de sensibilidad ± 0,01 pH. Se valoró con NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,1, usando 1 mL de zumo diluido en 25 mL de agua destilada. Los resultados son el valor medio ± ES y se expresaron como g ácido málico equivalentes 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco.

### 3.2.8. Fenoles totales

La **extracción de fenoles** fue realizada como se describe en Tomás-Barberán et al. (2001) con pequeñas modificaciones. En un tubo de centrífuga rodeado de hielo picado se colocaron 2 g de pulpa de cereza, 10 mL de agua:metanol (2:8) conteniendo FNa 2 mM (para inactivar la actividad de la polifenoloxidasas y prevenir la degradación fenólica). Se homogeneizó en un Polytron (IKA T18 basic, Ultraturrax) durante 1 minuto y se centrifugó a 15.000 x g en una centrífuga C30P (B. Braun Biotech International) durante 15 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se guardó en tubos Eppendorf para su posterior cuantificación. Estas extracciones se realizaron por

duplicado para cada una de las bolsas, como había 3 bolsas de un mismo tratamiento, se realizaron 6 extracciones por tratamiento y fecha de muestreo.

Para la **determinación** del contenido en fenoles se usaron los extractos en metanol y se cuantificaron usando el reactivo Folin-Ciocalteu que reacciona con los fenoles dando un color azul característico. En un tubo de ensayo se añadieron 200  $\mu$ L de extracto de muestra, 300  $\mu$ L de tampón fosfato y 2,5 mL de reactivo Folin diluido 1/10. Se agitó y se dejó reposar durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 2 mL de disolución 75 g/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para parar la reacción y se agitó. Se introdujeron los tubos en un baño a 50 °C durante 5 minutos.

Finalmente, se procedió a la lectura mediante espectrofotometría a 760 nm en un espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec (Shimadzu). Se realizó una recta de calibrado con el patrón ácido gálico. Los resultados fueron expresados como mg ácido gálico equivalentes (GAE) 100  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco y fueron la media  $\pm$  ES.

### 3.2.9. Antocianinas

Las antocianinas totales se extrajeron y determinaron según García-Viguera et al. (1999) con pequeñas modificaciones (Serrano et al., 2005). En un tubo de centrifuga rodeado de hielo picado se añadieron 5 g de pulpa de cereza, 15 mL de agua:metanol (2:8) conteniendo FNa 2 mM (para inactivar la actividad de la polifenoloxidasas y prevenir la degradación fenólica). Se homogeneizó en un Polytron (IKA T18 basic, Ultraturrax) durante 1 minuto y se centrifugó a 15.000 x g en una centrifuga C30P (B. Braun Biotech International) durante 15 minutos a 4 °C. La purificación se realizó mediante un Sep-Pak C-18. En primer lugar se activó el Sep-Pak pasando a través de él: 5 mL de metanol HPLC, 5 mL de agua ultra pura y 5 mL de HCL 0,01 N. Con esto se creó un ambiente polar para que las antocianinas se fijaran en el Sep-Pak. A continuación se pasaron 5 mL de sobrenadante de los tubos de centrifuga 3 veces consecutivas, 5 mL de agua ultra pura para lavar las sustancias hidrosolubles y los antocianinas se recogieron con 3 mL de metanol con un 1 % de ácido clorhídrico. Estas extracciones se realizaron por duplicado para cada una de las bolsas y como había 3 bolsas de un mismo tratamiento, se realizaron 6 extracciones por tratamiento y fecha de muestreo.

El extracto obtenido se introdujo en una cubeta y se procedió a la lectura mediante espectrofotometría a 520 nm en un espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec (Shimadzu). Los resultados se calcularon como cianidín 3-glucósido equivalentes (CGE) y se expresaron como mg equivalentes de cianidín 3-glucósido por 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar de esta antocianina ( $\epsilon = 29.600 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) y su peso molecular (449,2 g mol<sup>-1</sup>). Los resultados fueron la media  $\pm$  ES.

### 3.2.10. Actividad antioxidante total

La actividad antioxidante total (AAT) fue cuantificada de acuerdo con Serrano et al. (2009), que permite determinar en la misma extracción, la AAT debida tanto a los componentes hidrosolubles (AAT-H) como liposolubles (AAT-L). Brevemente, para cada muestra, en un tubo de centrífuga rodeado de hielo picado se añadieron 2 g de tejido y se homogeneizaron en 10 mL de tampón fosfato 50 mM pH= 7,8 y 3 mL de acetato de etilo. Se homogeneizó en un Polytron durante 1 minuto y se centrifugó a 15.000 rpm en una centrífuga C30P (B. Braun Biotech International) durante 15 minutos a 4 °C.

La fase superior se usó para determinar la AAT debida a los compuestos liposolubles (AAT-L) y la fase inferior para la actividad antioxidante total debida a los compuestos hidrosolubles (AAT-H). En ambos casos, la AAT se determinó usando el sistema enzimático compuesto por el cromóforo 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS), la enzima peroxidasa (HRP) y su substrato (peróxido de hidrógeno) que genera radicales ABTS<sup>•+</sup> de color verde-azulado que pueden medirse espectrofotométricamente a 730 nm. La disminución de absorbancia después de añadir el extracto de muestra fue proporcional a la AAT de la muestra. Se realizó una curva de calibrado con Trolox (ácido (R)-(+)-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-croman-2-carboxílico) (0-20 nmol) de Sigma (Madrid, España), y los resultados se expresaron como mg de Trolox equivalentes (TE) 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco.

### 3.2.11. Carotenoides

Los carotenoides totales se extrajeron de acuerdo con Valero et al. (2011). Brevemente, se extrajeron los carotenoides de 2 g de cereza con acetona y se agitaron con éter dietílico y 10 % ClNa para la separación de las dos fases. La fase liposoluble se lavó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 %), se saponificó con 10 % KOH en metanol, y los pigmentos se extrajeron posteriormente con éter dietílico, el cual se evaporó y después el residuo seco se diluyó y enrasó con acetona hasta 25 mL.

Los carotenoides totales se estimaron mediante la lectura de absorbancia a 450 nm y se expresaron como mg de β-caroteno equivalentes (β-CE) 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco, teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar ε= 2.560, y los resultados fueron la media ± ES.

### 3.2.12. Enzimas antioxidantes

Para obtener el extracto para el análisis de enzimas SOD, CAT, APX y POD se homogeneizaron 5 g de muestra congelada con 10 mL de tampón fosfato 50 mM, pH=7 conteniendo 1% (p/v) polivinilpirrolidona (PVP) y 1 mM ácido etildiaminotetraacético (EDTA). El homogeneizado se centrifugó a 15.000 x g en una centrífuga C30P (B. Braun Biotech International) durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para realizar los ensayos enzimáticos.

#### a) Peroxidasa (POD)

La enzima POD se determinó según publicaciones previas (Zapata et al., 2014), en una mezcla de reacción conteniendo tampón fosfato 50 mM pH=7,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12 mM, guayacol 14 mM y 100 μL de extracto enzimático en un volumen total de 3 mL. Se midió el incremento de absorbancia a 470 nm, debido a la oxidación del guayacol, durante 1 minuto. Una unidad enzimática (U) fue definida como el incremento de absorbancia de 0,01 por minuto, y la actividad peroxidasa se expresó como U min<sup>-1</sup>mg proteína<sup>-1</sup>. Los resultados fueron la media ± ES.

**b) Catalasa (CAT)**

Para determinar la actividad catalasa se utilizó el protocolo descrito por Zhang et al. (2013). Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de extracto a 2,9 mL de una mezcla de reacción conteniendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 mM y tampón fosfato 50 mM pH=7,0. La degradación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue medida por la disminución de absorbancia a 240 nm durante 1 min. Una unidad enzimática (U) fue definida como la disminución de 0,01 de absorbancia por minuto, y la actividad CAT expresada como  $\text{U min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$ . Los resultados fueron la media  $\pm$  ES.

**c) Ascorbato peroxidasa (APX)**

La cuantificación de la actividad ascorbato peroxidasa se realizó según Zhang et al. (2013). La mezcla de ensayo contenía tampón fosfato 50 mM pH= 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM y  $\text{H}_2\text{O}_2$  1mM. Se midió el descenso de absorbancia a 290 nm durante 1 min. Una unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de ascorbato por minuto, y la actividad APX se expresó como  $\text{U min}^{-1}\text{ mg proteína}^{-1}$ . Los resultados fueron la media  $\pm$  ES.

**d) Superoxido dismutasa (SOD)**

La actividad de la enzima SOD se determinó mediante la inhibición de la reducción fotoquímica de nitro blue tetrazolium (NBT) en presencia de riboflavina como se describe en Zhang et al. (2013) con pequeñas modificaciones. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato 50 mM, pH 7,8, metionina 5 mM, EDTA 100  $\mu\text{M}$  y 65  $\mu\text{M}$  nitro-blue-tetrazolium (NBT). A 2,9 mL de esta solución se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de extracto de enzima y 40  $\mu\text{L}$  de ribloflavina 0,15 mM. La reacción comenzó cuando se añadió riboflavina, y después de 50 minutos de incubación a temperatura ambiente bajo luz fluorescente (40 W, 10 min), se midió la formación de formazan azul a 560 nm de absorbancia. Una unidad (U) de actividad de SOD es definida como la cantidad de enzima que causa el 50% de inhibición de reducción de NBT bajo las condiciones de ensayo. Los resultados se expresaron como  $\text{U mg proteína}^{-1}$ . Los resultados fueron la media  $\pm$  ES.

### **3.2.13. Proteínas**

El contenido total de proteínas en el extracto enzimático fue cuantificado según Bradford (1976). Este método permite añadir un colorante ácido, de color rojo, a una solución de proteínas. Cuando el colorante se une a las proteínas, el color rojo pasa a azul y puede ser medido mediante espectrofotometría a 595 nm.

Para determinar la concentración de proteína total presente en la muestra se realizó una curva de calibrado empleando la proteína patrón seroalbúmina bovina (BSA) a las siguientes concentraciones: 10, 30, 50, 70 y 90 µg.

### **3.2.14. Análisis sensorial**

El análisis sensorial se realizó en el experimento de 2013 en frutos control y tratados. Se seleccionaron diez panelistas, previamente entrenados con muestras comerciales de cerezas, para llevar a cabo una caracterización sensorial de los lotes estudiados. De las 100 cerezas recolectadas en la última fecha de muestreo para cada árbol (o réplica), variedad y tratamiento, se eligió una muestra de 5 frutos al azar, y se presentaron a cada panelista para su evaluación. El análisis descriptivo se realizó de acuerdo con métodos estándar internacionales (ISO 4121-2006, 2006) para evaluar la apariencia, color de la piel, sabor de la cereza, dulzor, acidez y firmeza mediante el uso de una escala numerada de 1 (pobre) a 10 (excelente).

### **3.2.15. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). Las fuentes de variación y los test utilizados quedan especifican en cada una de las publicaciones del capítulo 4 y de los artículos del capítulo 5.





## **Capítulo 4. Artículos Publicados**

---

*Miguel  
Hernández*



---

# PUBLICACIÓN 1

---

## TRATAMIENTOS DE CEREZOS CON SALICILATO DE METILO MEJORAN LA CALIDAD DE LAS CEREZAS EN LA RECOLECCIÓN Y DURANTE EL ALMACENAMIENTO

---

M.J. Giménez<sup>1</sup>, J.M. Valverde<sup>1</sup>, D. Valero<sup>1</sup>, H.M. Díaz-Mula<sup>1</sup>, P.J. Zapata<sup>1</sup>, M. Serrano<sup>2</sup>, J. Moral<sup>3</sup> y S. Castillo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

<sup>2</sup> Departamento de Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

<sup>3</sup> Departamento de Mejora Genética Vegetal. Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Avd. Menéndez Pidal, S/N, 14080, Córdoba, España.

---

***Scientia Horticulturae 2015 (En prensa)***

*[dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.033](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.033)*

## Tratamientos de cerezos con salicilato de metilo mejoran la calidad de las cerezas en la recolección y durante el almacenamiento

M.J. Giménez<sup>1</sup>, J.M. Valverde<sup>1</sup>, D. Valero<sup>1</sup>, H.M. Díaz-Mula<sup>1</sup>, P.J. Zapata<sup>1</sup>, M. Serrano<sup>2</sup>, J. Moral<sup>3</sup> y S. Castillo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España

<sup>3</sup>Departamento de Mejora Genética Vegetal. Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Avd. Menéndez Pidal, S/N, 14080, Córdoba, España

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los tratamientos de cerezos con salicilato de metilo (SaMe) sobre las propiedades de calidad del fruto en el momento de la recolección y durante el almacenamiento refrigerado. Los experimentos se realizaron durante dos años consecutivos usando dos variedades, 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' en 2013, y tres variedades, 'Sweet Heart', 'Sweet Late' y 'Lapins' en 2014. En los experimentos de 2013, se aplicó SaMe a tres concentraciones (0,5, 1 y 2 mM) en tres puntos clave del desarrollo del fruto y los resultados mostraron que la concentración 1mM fue la más apropiada en términos de incrementar el tamaño del fruto y los parámetros de calidad (mejoró el color, la firmeza y sólidos solubles totales) en el momento de la recolección. Los análisis sensoriales revelaron que las calificaciones para la apariencia, firmeza y dulzor fueron mayores en las cerezas tratadas con SaMe 1 mM que en las cerezas control. Por tanto, la concentración 1 mM fue la elegida para los experimentos de 2014, con la que se encontró que los tratamientos con SaMe no afectaron al rendimiento total del árbol. Tanto los frutos control como los tratados con SaMe 1mM fueron almacenados a 2 °C y una humedad relativa (HR) del 85 % durante 28 días y los resultados mostraron que los tratamientos pre-cosecha con SaMe retrasaron los procesos de maduración post-cosecha, manifestado por un menor grado en los cambios de color, y menor pérdida de acidez y firmeza en frutos tratados con respecto a los controles, dando lugar al mantenimiento de la calidad del fruto. En general, los tratamientos pre-cosecha con SaMe 1 mM en tres puntos clave del crecimiento y maduración de las cerezas mejoraron los atributos de calidad del fruto en el momento de la recolección y después del almacenamiento

post-cosecha, mostrando que SaMe podría ser una herramienta segura y respetuosa con el medio ambiente, con una potencial aplicación práctica para mejorar la calidad de las cerezas.

©2015 Elsevier B.V. Todos los derechos reservados.

**Palabras clave:** tamaño del fruto, firmeza, salicilato de metilo, sólidos solubles, cereza, rendimiento.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ácido salicílico (AS) es una hormona vegetal que presenta diversas funciones reguladoras en el metabolismo de las plantas, tales como mecanismos de resistencia frente a enfermedades y resistencia sistémica adquirida (RSA), al igual que influye en otros parámetros del desarrollo, como la germinación de semillas, el establecimiento de las plántulas, crecimiento celular, cierre estomático, respuestas al estrés abiótico y el rendimiento del fruto (Raskin, 1992; Vlot et al., 2009). El salicilato de metilo (SaMe) es un compuesto volátil de las plantas sintetizado a partir del AS y juega también un papel importante en los mecanismos de defensa de las plantas, desarrollo de las plantas, procesos de maduración del fruto y respuestas de las plantas frente a varios factores de estrés abiótico (Hayat y Ahmad, 2007). Así, tratamientos post-cosecha con SaMe exógeno disminuyeron los daños por frío en tomate (Fung et al., 2006), y mango (Han et al., 2006), debido a la protección de la estructura de la pared celular y de las membranas celulares de la disfunción causada por los daños de la peroxidación lipídica. Del mismo modo, en granadas, los daños por frío se redujeron por tratamientos post-cosecha con SaMe debido al mantenimiento de la estructura de las membranas y de su permeabilidad selectiva. Además, se mantuvieron otros parámetros relacionados con la calidad del fruto, tales como firmeza, sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT) en frutos tratados con SaMe, mientras que se produjeron pérdidas significativas en granadas control (Sayyari et al., 2011).

La cereza (*Prunus avium* L.) es un fruto de hueso muy apreciado por los consumidores debido a su excelente apariencia, precocidad y atributos de calidad, especialmente aquellos relacionados con el color rojo brillante, firmeza, dulzor y flavor (Díaz-Mula et al., 2009; Valero y Serrano, 2010; Serradilla et al., 2012). Para mejorar los parámetros de calidad de las cerezas en el momento de la recolección (tales como tamaño, color, sólidos solubles totales y firmeza), se han empleado diversos tratamientos pre-cosecha. Así, el ácido giberélico (sólo o combinado con Ca-prohexadiona) aplicado en cerezos en distintos puntos de desarrollo del fruto dio lugar a frutos con mayor peso y tamaño, SST y firmeza y mejoró la resistencia al picado (Zhang y Whiting, 2011; Einhorn et al., 2013). Además, tratamientos de cerezas con ácido oxálico (AO) a 0,5, 1 y 2 mM a los 98, 112 y 126 días después de la plena floración (DDPF) dieron lugar a frutos con mayor volumen, peso, color, firmeza, antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante que los encontrados en los frutos control, aunque no se encontraron diferencias significativas en SST o AT (Martínez-Esplá et al., 2014). Tratamientos pre-cosecha con AS o ácido acetilsalicílico (AAS), aplicados en cerezos mediante pulverización foliar, también incrementaron el tamaño del fruto, color, firmeza y actividad antioxidante en la recolección comercial (Giménez et al., 2014). Por otro lado, tratamientos post-cosecha de cerezas con AS o AAS retrasaron el proceso de maduración post-cosecha, manifestado por un menor grado en los cambios de color, menor pérdida de acidez y firmeza, y mantuvieron un mayor contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante, dando lugar a frutos con mayores atributos de calidad si los comparamos con los frutos control (Valero et al., 2011). Sin embargo, las aplicaciones comerciales de tratamientos post-cosecha para preservar la calidad del fruto son restrictivas, debido a las directivas legales de los diferentes países y se necesitan más investigaciones para encontrar tratamientos pre-cosecha con efectos sobre el mantenimiento de los atributos de calidad del fruto durante el almacenamiento, especialmente en frutos que se deterioran rápidamente, como son las cerezas (Esti et al., 2002; Alique et al., 2005; Serrano et al., 2009).

Hasta donde sabemos, no existe literatura científica disponible sobre el posible efecto del tratamiento con SaMe, ni en pre- ni en post-cosecha, sobre los atributos de

calidad de las cerezas. Por tanto, este es el primer estudio en el cual se evaluó el efecto de tratamientos pre-cosecha con SaMe en cerezos para evaluar el rendimiento de la cosecha y los parámetros de calidad del fruto en el momento de la recolección y durante el almacenamiento refrigerado durante largos periodos. En el experimento de 2013, se aplicaron tres concentraciones (0,5, 1 y 2 mM) de SaMe en las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' y en el año 2014 sólo se eligió y aplicó la concentración 1 mM en las variedades 'Sweet Heart', 'Sweet Late' y 'Lapins'.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal

Los experimentos se llevaron a cabo en una finca comercial "Fincas Toli S.L." localizada en Jumilla (Murcia, España), con las variedades de cereza 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', durante la primavera-verano de 2013 y 2014. Se realizó otro ensayo en una finca comercial "Cerezas Aitana" (Alicante, España) con la variedad de cereza 'Lapins' durante 2014.

### 2.2. Diseño Experimental

En el experimento de 2013 se seleccionaron dos filas separadas, una para cada variedad, en la explotación de "Fincas Toli S.L.". Se seleccionaron doce árboles de cada variedad según un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas de un árbol por tratamiento. Los tratamientos evaluados fueron: control (agua destilada) y salicilato de metilo (SaMe) a 0,5, 1 y 2 mM. En 2014, se seleccionaron 10 árboles (réplicas) de cada variedad completamente al azar para cada uno de los tratamientos siguientes: control (agua destilada) y SaMe a 1mM, ya que esta fue la dosis con la que previamente se obtuvieron los mejores resultados en el experimento de 2013. Para ambos años, los dos primeros y dos últimos árboles de cada fila se consideraron árboles guardia y cada uno de los árboles tratados fue separado por dos árboles sin tratar para evitar contaminación cruzada. Los tratamientos se realizaron mediante pulverización foliar con soluciones de SaMe recién preparadas (conteniendo un 0,5 % de Tween 20) usando un pulverizador mecánico (7,5 L/árbol, el cual fue suficiente para

humedecer toda la copa del árbol). Este procedimiento se repitió en 3 fechas del ciclo de crecimiento, que se correspondían con tres puntos clave en el proceso de desarrollo del fruto, de acuerdo con experimentos previos: T1 (lignificación del hueso), T2 (cambios de color iniciales) y T3 (inicio de la maduración) (Fig. 1).

En el experimento de 2013, una semana antes del tratamiento T1, se etiquetaron 20 frutos de cada árbol alrededor del perímetro ecuatorial, en el que se siguió el crecimiento del fruto a través de la medida del diámetro polar, ecuatorial y de sutura, y después se calculó el volumen de acuerdo con Díaz-Mula et al. (2009). Semanalmente, desde una semana antes del tratamiento T1 hasta la recolección comercial, se recolectaron 20 frutos (similares a aquellos etiquetados previamente) para cada árbol (o réplica) para realizar posteriores determinaciones analíticas: peso del fruto, firmeza, color, SST y AT. Todas las cerezas se recolectaron en el estado de madurez comercial, de acuerdo con el técnico de la finca y basándose en el color visual usando la escala de color CTIFL, que fue 5 para la variedad 'Lapins' y 4 para las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', de acuerdo con investigaciones previas (Díaz-Mula et al., 2009).

En el experimento de almacenamiento de 2013, se seleccionaron 300 frutos de cada variedad procedentes de árboles control y tratados con SaMe 1mM, homogéneos en color y tamaño y sin defectos visuales. Los 300 frutos se agruparon al azar en 15 lotes de 20 frutos, se pesaron y almacenaron a 2 °C y HR del 85 %. Se tomaron al azar tres lotes después de 0, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento + 1 día a 20 °C y HR del 70 % para realizar determinaciones analíticas. Además, se seleccionaron otros lotes de 100 frutos de cada árbol, tanto de árboles control como de árboles tratados con SaMe 1 mM, para realizar el análisis sensorial.

En el experimento de 2014, se registró la producción total de fruta, de cada uno de los 10 árboles tratados y de los controles, y la producción fue expresada como kilogramo por árbol. De cada árbol, se tomaron 3 lotes de 100 frutos al azar y se usaron para calcular el peso del fruto en la recolección. Después, se seleccionaron 300 frutos, homogéneos en color y tamaño y sin defectos visuales, para cada variedad de árboles control y tratados con SaMe 1 mM y se agruparon al azar en 15 lotes de 20 frutos para su almacenamiento como en el experimento de 2013.



### 2.3. Parámetros de calidad del fruto

El color se determinó en la superficie de cada cara de los 20 frutos para cada réplica, con un colorímetro Minolta (CRC 200, Minolta Camera Co., Japón), usando las coordenadas CIELab y expresando los resultados como el índice  $a^*/b^*$ . La firmeza se determinó independientemente en 20 frutos de cada réplica usando un Texturómetro TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, UK) conectado con un ordenador personal, con un plato plano de acero montado sobre el texturómetro. Para cada fruto, se midió su diámetro y se aplicó una fuerza hasta alcanzar una deformación del 3% del diámetro del fruto. Los resultados se expresaron como la relación fuerza-deformación ( $N\ mm^{-1}$ ) y fueron la media  $\pm$  ES. Posteriormente, los 20 frutos de cada muestra se cortaron en pequeñas piezas para obtener una muestra homogénea para cada réplica. Los sólidos solubles totales (SST) se midieron por duplicado en el zumo obtenido de 5 g de cada muestra con un refractómetro digital Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japón) a 20 °C, y se expresaron como  $g\ 100\ g^{-1}$ . La acidez total (AT) se determinó por duplicado en el mismo zumo mediante titulación automática (785 DMP Titrino (Metrohm) con NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,1, usando 1 mL de zumo diluido en 25 mL de agua destilada, y los resultados se expresaron como g de ácido málico equivalentes  $100\ g^{-1}$  de peso fresco.

### 2.4. Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó en el experimento de 2013 en los frutos control y frutos tratados con SaMe 1mM. Se seleccionaron diez panelistas, previamente entrenados con muestras comerciales de cerezas, para llevar a cabo una caracterización sensorial de los lotes estudiados. De las 100 cerezas recolectadas en la última fecha de muestreo para cada árbol (o réplica), variedad y tratamiento, se eligió una muestra de 5 frutos al azar, y se presentaron a cada panelista para su evaluación. El análisis descriptivo se realizó de acuerdo con métodos estándar internacionales (ISO 4121-2003, 2003) para evaluar la apariencia, color de la piel, sabor de la cereza, dulzor, acidez y firmeza mediante el uso de una escala numerada de 1 (pobre) a 10 (excelente).

## 2.5. Análisis estadístico

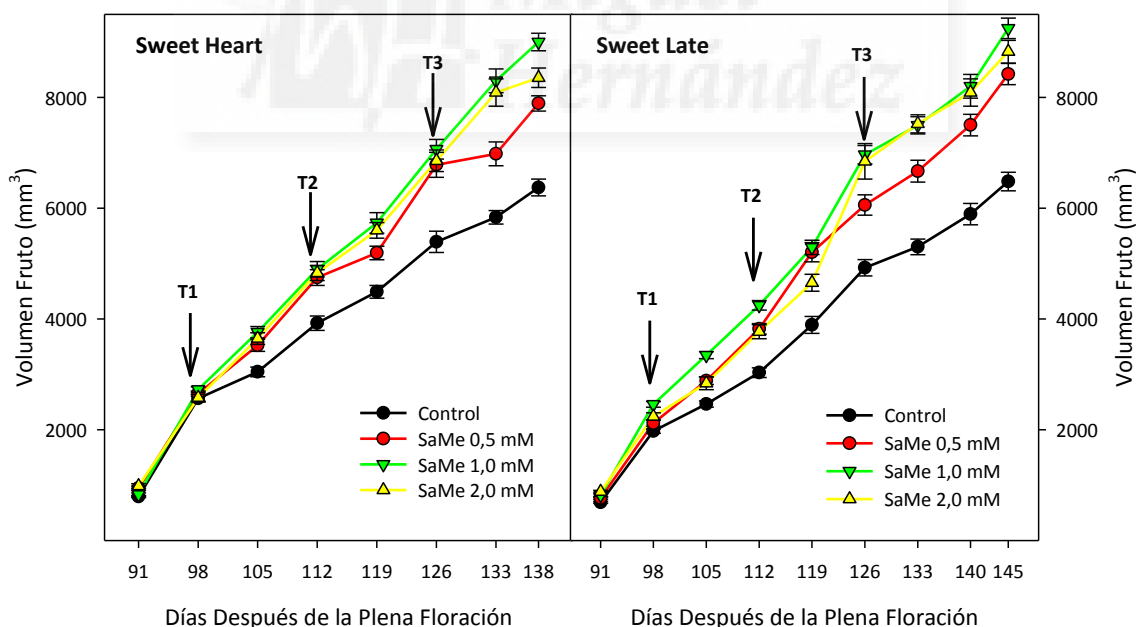
Los experimentos se realizaron según un diseño completamente aleatorizado para cada variedad, tanto de las variedades localizadas en Jumilla ('Sweet Heart' y 'Sweet Late') como en Alicante ('Lapins'), o año. Para los experimentos de crecimiento del fruto y maduración en el árbol, el número de réplicas fue 3 y 10 en el año 2013 y 2014 respectivamente. Para los experimentos de almacenamiento, se usaron 3 réplicas para ambos años. Las variables dependientes (color del fruto, firmeza, peso del fruto, kg árbol<sup>-1</sup>, SST, AT y volumen) se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y realizó una comparación de medias usando el test de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) a  $p=0,05$ . Los distintos errores experimentales se calcularon incluyendo el error entre réplica de árboles, entre los frutos de un mismo árbol y entre los frutos de un mismo lote. En el caso de los datos de la cosecha de 2014 (peso del fruto y kg árbol<sup>-1</sup>), se estudió el efecto del tratamiento (frutos tratados vs. frutos control) usando el test T de dos muestras considerando varianzas iguales o desiguales según el test Folded F. Finalmente, los datos resultantes del análisis sensorial se analizaron usando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y las filas medias de variedades se compararon usando el test de Dunn a  $p=0,05$ . Debido a que estábamos más interesados en el efecto de los tratamientos que en el efecto de la variedad o la interacción, las pruebas estadísticas se aplicaron de forma separada a cada variedad estudiada. Los datos de todos los experimentos se analizaron usando Statistix 10 (Analytical Software, Tallahassee, FL).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Crecimiento del fruto en el árbol y rendimiento de la cosecha

En el experimento de 2013, se observó que el volumen de las cerezas aumentó durante el desarrollo en el árbol, aunque fue generalmente mayor en aquellas cerezas tratadas con las tres concentraciones de SaMe para ambas variedades, que se estudiaron individualmente, siendo el efecto evidente desde la primera aplicación (T1). Además, debido a que el efecto de la interacción día-tratamiento no fue significativo ( $p < 0,001$ ) en ambas variedades, se estudió por separado el efecto del tratamiento sobre el volumen del fruto para cada fecha de muestreo. En general, se obtuvieron mayores efectos con la dosis 1 mM, con la que se consiguieron incrementos del

volumen del fruto del 41 y 42 % para las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', respectivamente, en el momento de la recolección (Fig.1). Se observó un comportamiento similar cuando se estudiaron las curvas de peso del fruto (datos no mostrados), siendo el tamaño final del fruto en el momento de la recolección significativamente mayor en todos los frutos tratados con SaMe que en los frutos control (Tabla 1). El efecto más destacado se obtuvo con los tratamientos SaMe 0,5 y 1 mM para la variedad 'Sweet Heart' y con las concentraciones 1 y 2 mM para la variedad 'Sweet Late' (Tabla 1). Basándose en los resultados de volumen y peso del fruto, se eligió la concentración 1 mM para realizar los experimentos en 2014. En ese año, se obtuvo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en peso del 12, 36 y 19 % para las cerezas tratadas con SaMe 1mM de las variedades 'Sweet Heart', 'Sweet Late' y 'Lapins', respectivamente, con respecto a los controles (datos non mostrados). Sin embargo, el rendimiento total, expresado como kg de fruto por árbol, no se vio afectado ( $p > 0,05$ ) por el tratamiento con SaMe, con una producción alrededor de 52, 35 y 27 kg por árbol, para las variedades 'Sweet Heart', 'Sweet Late' y 'Lapins', respectivamente.



**Fig. 1** Efecto del tratamiento con salicilato de metilo (SaMe) a 0,5, 1 y 2 mM sobre el volumen del fruto ( $\text{mm}^3$ ) en las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' durante el desarrollo del fruto en el árbol en el experimento de 2013. T1, T2 y T3 muestran los días de tratamiento. Los datos son la media  $\pm$  ES (grados de libertad = 8).

**Tabla 1.** Datos en la recolección para el peso del fruto, acidez total (AT) y firmeza de dos variedades de cerezas tratadas con Salicilato de metilo (SaMe) durante los experimentos de 2013.

Variedad	SaMe	Peso (g)	AT (g 100 g <sup>-1</sup> )	Firmeza (N mm <sup>-1</sup> )
'Sweet Heart'	0 mM	7,07 a	1,59 a	2,89 a
	0,5 mM	9,11 b	1,53 a	3,18 b
	1,0 mM	9,02 b	1,69 b	3,59 c
	2,0 mM	8,61 c	1,72 b	3,18 b
'Sweet Late'	0 mM	6,84 a	1,35 a	2,61 a
	0,5 mM	8,14 b	1,40 ab	3,65 b
	1,0 mM	8,97 c	1,48 b	4,01 c
	2,0 mM	8,84 c	1,43 ab	4,03 c

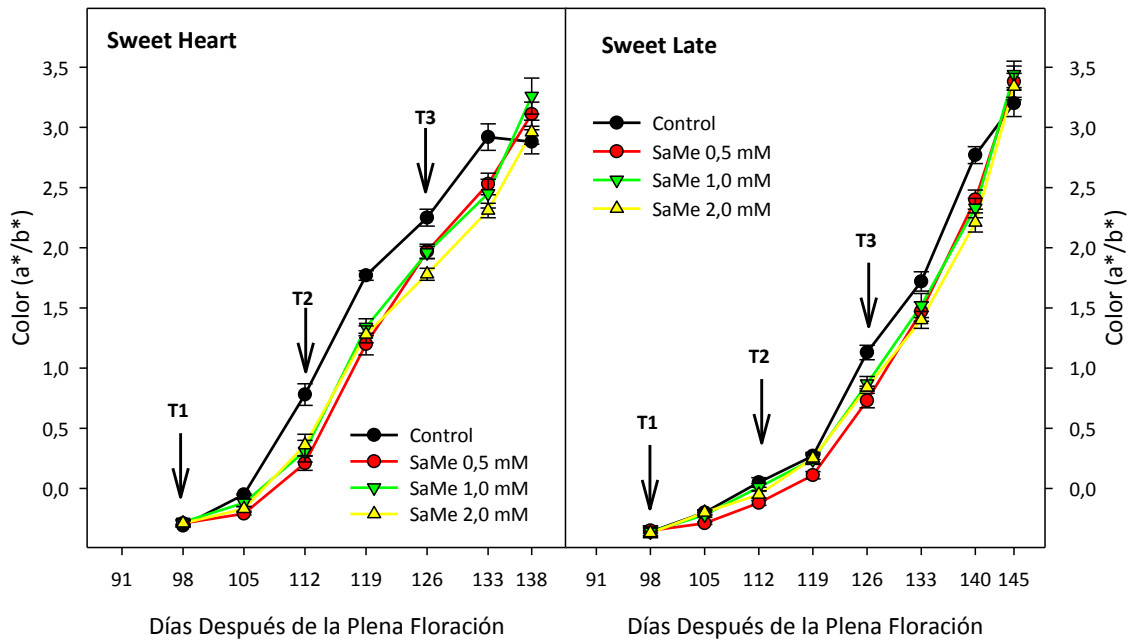
Para cada columna y variedad, el valor medio con letras diferentes presentan diferencias significativas de acuerdo con el test LSD o T a  $p = 0,05$ .

Los resultados muestran que tratamientos con SaMe podrían mejorar el rendimiento económico de este cultivo, ya que aunque no se modificó el rendimiento total, se obtuvieron cerezas más grandes, que son más apreciadas por los consumidores y alcanzan mayores precios en el mercado comparadas con las más pequeñas. Del mismo modo, tratamientos de cerezos con AS y AAS y tratamientos de melocotoneros con AS (aplicados en tres fechas durante el ciclo de crecimiento) aumentaron el peso del fruto sin efectos significativos sobre el rendimiento total (Ali et al., 2014; Giménez et al., 2014; Hendricks et al., 2015). Sin embargo, el SaMe aplicado a plantas de pimientos al principio de la etapa de floración, dio lugar a frutos con mayor peso en el momento de la recolección, pero en este caso el rendimiento total también aumentó debido a un incremento del número de frutos (Elwan y El-Hamahmy, 2009). Estas diferencias de comportamiento pueden ser atribuidas al hecho de que en las plantas de pimiento se produce una floración continua durante el ciclo de crecimiento, mientras que en cerezos existe una única etapa de floración y los tratamientos empezaron 98 DDPF. En conformidad, en olivos, la pulverización foliar con AS incrementó el peso del fruto, tamaño y rendimiento debido a un aumento

tanto en el número de flores como en la densidad, puesto que los tratamientos se realizaron un mes antes de la floración (El-Razek et al., 2013). Por tanto, podría ser interesante investigar si tratamientos con SaMe aplicados en cerezos antes de la floración, combinados con tratamientos durante el crecimiento del fruto, serían capaces de aumentar la producción del número de frutos por árbol aparte del tamaño del fruto.

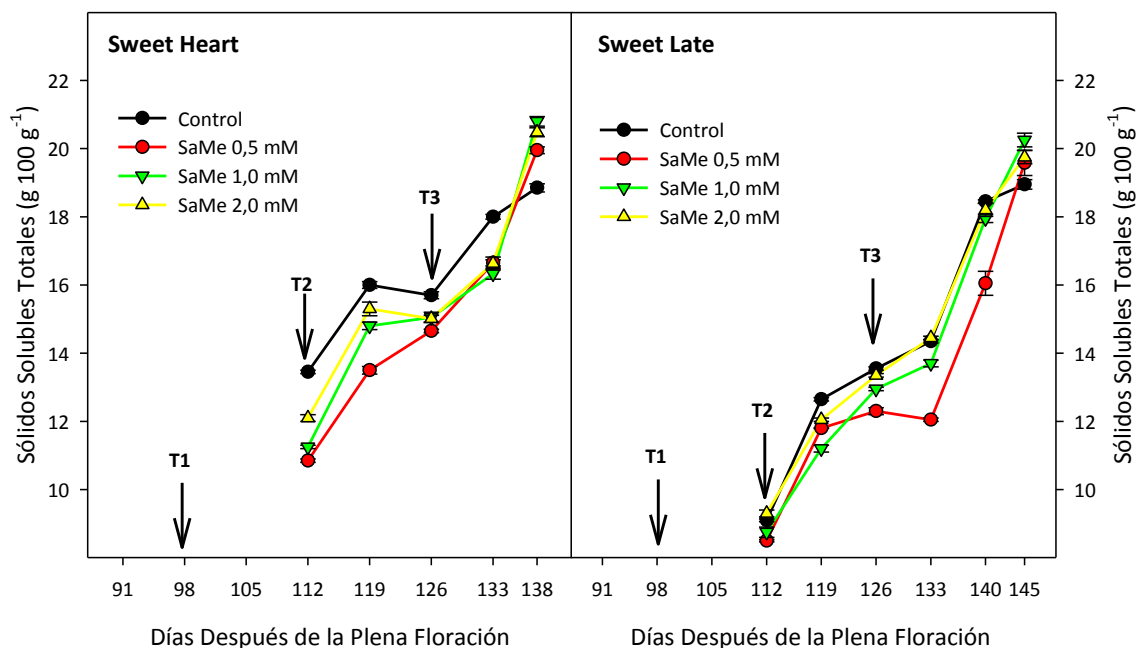
### **3.2. Evolución de los parámetros de calidad del fruto durante el crecimiento y maduración en el árbol**

En el experimento de 2013, el tratamiento, el DDPF y su interacción, afectó ( $p < 0,05$ ) al índice de color ( $a^*/b^*$ ) en ambas variedades. Por ello, se estudió el efecto de los tratamientos de forma separada para cada día. En general, el índice de color aumentó durante el desarrollo (Fig. 2), la evolución se retardó en cerezas tratadas con SaMe, desde 112 y 133 DDPF y hasta 126 y 140 DDPF, para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', respectivamente. Sin embargo, en el momento de la recolección las cerezas de ambas variedades tratadas con SaMe a 1 mM mostraron un índice de color significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor comparado con los controles, mientras que no se obtuvo un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) para las concentraciones de SaMe de 0,5 y 2 mM.



**Fig. 2** Efecto del tratamiento con salicilato de metilo (SaMe) a 0,5, 1 y 2 mM sobre el índice de color del fruto ( $a^*/b^*$ ) en las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' durante el desarrollo del fruto en el árbol en los experimentos de 2013. T1, T2 y T3 muestran los días de tratamiento. Los datos son la media  $\pm$  ES (grados de libertad = 8).

Con respecto a los SST (Fig. 3), también se observó un aumento continuo durante el crecimiento y maduración para todos los frutos control y tratados, aunque la concentración 0,5 mM de SaMe indujo un retraso significativo en la acumulación de SST en ambas variedades. Sin embargo, en el momento de la recolección, las cerezas 'Sweet Heart' tratadas tuvieron una concentración de SST significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor comparado con los controles ( $\cong 18,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) para todas las concentraciones de SaMe aplicadas, encontrándose el mayor efecto con las concentraciones 1 y 2 mM de SaMe, para las cuales se alcanzaron concentraciones de SST cercanas a  $21 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ . De forma similar, la concentración de SST en 'Sweet Late' fue mayor en frutos tratados que en control, teniendo significativamente el mayor contenido en SST las cerezas tratadas con SaMe 1 mM ( $20,25 \pm 0,20 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).



**Fig. 3** Efecto del tratamiento con salicilato de metilo (SaMe) a 0,5, 1 y 2 mM sobre los sólidos solubles totales (SST, g 100 g<sup>-1</sup>) en las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' durante el desarrollo del fruto en el árbol en los experimentos de 2013. T1, T2 y T3 muestran los días de tratamiento. Los datos son la media  $\pm$  ES (grados de libertad = 8).

De forma similar, la AT aumentó durante el ciclo de crecimiento pero sin diferencias significativas entre las cerezas control y las tratadas, por lo tanto, sólo se proporcionaron los datos de la última fecha de muestreo para este parámetro de calidad (Tabla 1). La AT en la fecha de recolección fue significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor en las cerezas 'Sweet Heart' tratadas con SaMe 1 y 2 mM que en las control, mientras que para la variedad 'Sweet Late' fue la dosis 1 mM la que dio frutos con mayor AT. Por el contrario, la firmeza del fruto disminuyó durante el crecimiento y maduración en el árbol tanto en las muestras control como en las tratadas (datos no mostrados), pero en el momento de la recolección los tratamientos de cerezos con SaMe dieron lugar a una firmeza del fruto significativamente mayor para ambas variedades, especialmente con la concentración 1 mM para 'Sweet Heart' y con dosis de 1 y 2 mM para 'Sweet Late' (Tabla 1).

Los aumentos en las concentraciones de SST y AT y en la intensidad de color rojo y las disminuciones en firmeza observadas en las variedades 'Sweet Heart' y

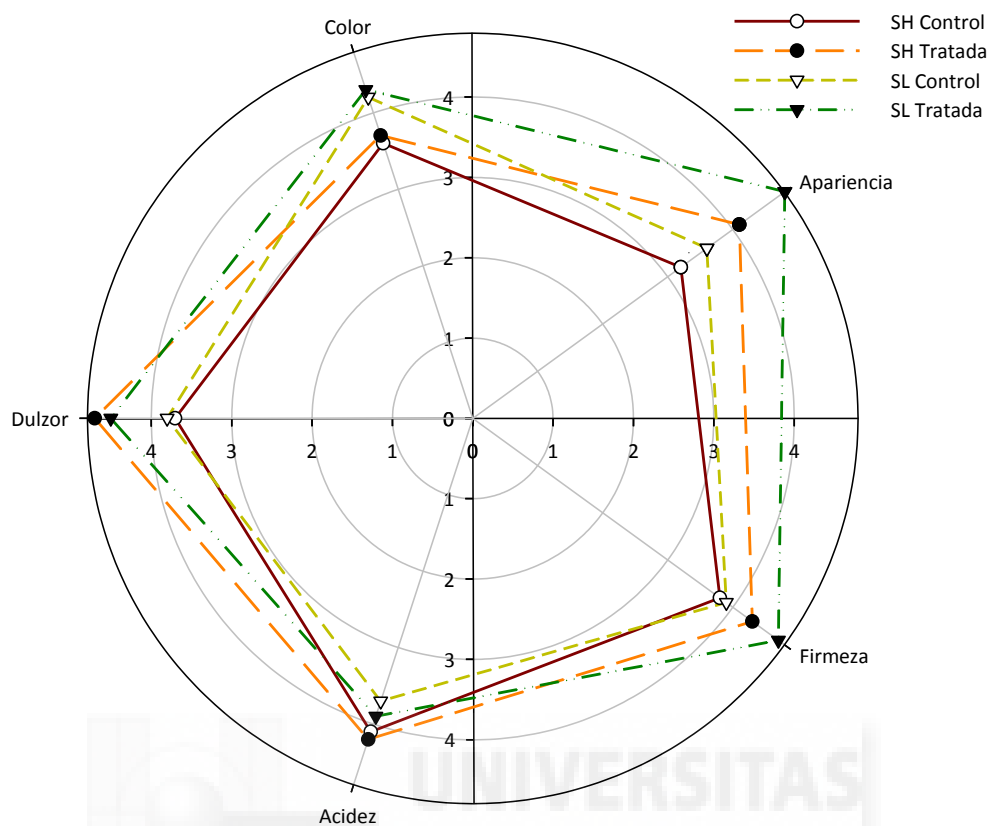
‘Sweet Late’ durante la maduración en el árbol están de acuerdo con publicaciones previas en una amplia gama de variedades de cerezas (Serrano et al., 2005; 2009; Díaz-Mula et al., 2009; Serradilla et al., 2012). En la recolección, el tratamiento con SaMe 1 mM dio lugar a cerezas con mayor índice de color  $a^*/b^*$ , y por tanto estos frutos también tendrían mayor concentración de antocianinas que los control, ya que se ha observado una estrecha relación entre el aumento en el índice de color  $a^*/b^*$  y la acumulación de antocianinas en una amplia gama de variedades de cerezas (Díaz-Mula et al., 2009; Serrano et al., 2009; Ballistreri et al., 2013). Sin embargo, de acuerdo con el técnico de la empresa y basándose en SST y color visual (usando la escala de color CTIFL) la fecha de recolección fue la misma para todos los frutos (control y tratados) aunque la determinación analítica de color con el colorímetro Minolta (una determinación del parámetro de color más precisa) reveló diferencias significativas en el color, que son atribuidas a los tratamientos. Además, los panelistas no encontraron diferencias significativas en color entre cerezas control y tratadas (como se comentará más adelante), estando de acuerdo con el criterio del técnico. De forma similar al color, los SST y la AT aumentaron durante el desarrollo en frutos control y tratados aunque en la recolección la concentración de SaMe 1 mM dio lugar a frutos con un contenido en SST y AT significativamente mayor que en los frutos control para ambas variedades. Es interesante resaltar que, los niveles de firmeza en el momento de la recolección también fueron significativamente mayores en cerezas tratadas con todas las concentraciones de SaMe que en las controles.

No hay información disponible sobre el efecto de tratamientos pre-cosecha con SaMe sobre los parámetros de calidad del fruto, aunque existen algunas evidencias con su análogo cercano AS. Por ejemplo, tratamientos pre-cosecha de naranjas con AS (a 2, 4, 6 y 8 mM) incrementaron la firmeza del fruto y las concentraciones de  $\beta$ -caroteno y licopeno y redujeron la podredumbre de la fruta en el momento de la recolección (Huang et al., 2008; Ahmad et al., 2013). En uvas de mesa, otro fruto no climatérico como las cerezas, tratamientos pre-cosecha con AS 2 mM indujeron bayas con mayor firmeza que las control en el momento de la recolección (Khalil, 2014). En estos frutos no climatéricos el proceso de maduración en el árbol no se vio afectado por tratamientos con AS y tanto los frutos control como los tratados fueron



recolectados en la misma fecha. Asimismo, en los presentes experimentos, no se observó efecto del tratamiento con SaMe sobre la fecha en que las cerezas alcanzaron su estado de madurez comercial, y los frutos control y tratados fueron recolectados en la misma fecha. Sin embargo, en frutos climatéricos tales como melocotón, la aplicación pre-cosecha de AS (a 1, 2 y 3 mM) retrasó significativamente el proceso de maduración en el árbol debido a la inhibición de la producción de etileno (Ali et al., 2014).

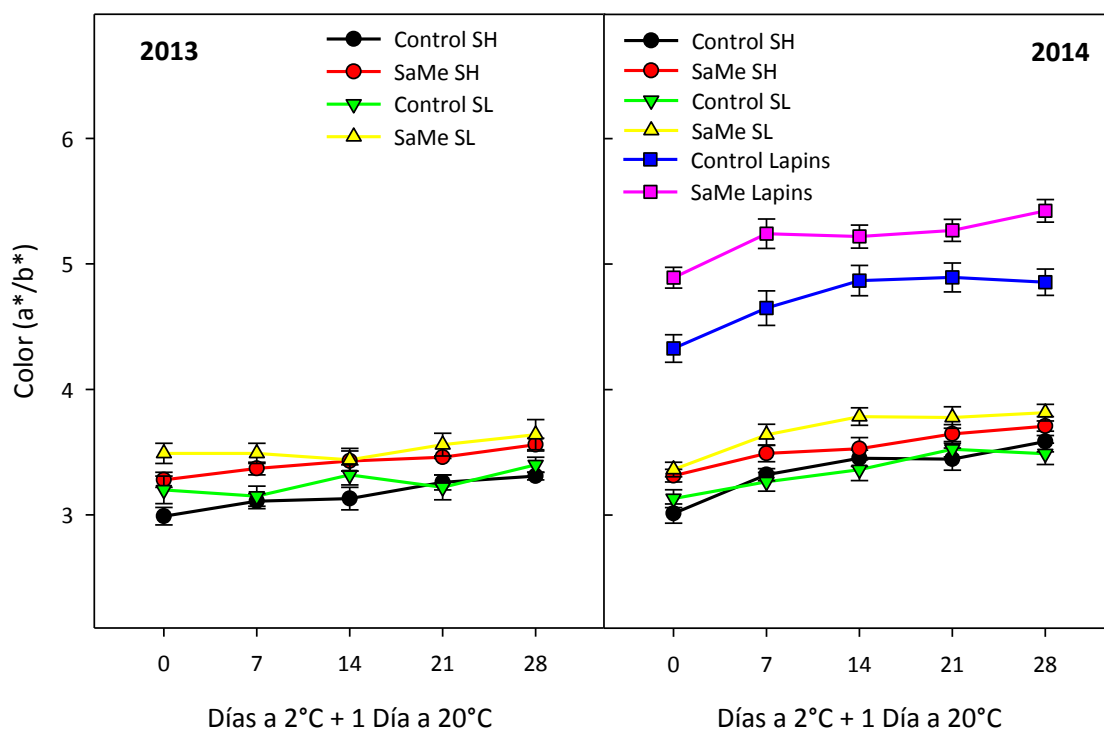
Por tanto, puesto que los mejores resultados sobre la mejora de la calidad de las cerezas en el momento de la recolección se obtuvieron con la dosis 1 mM, estos frutos fueron los seleccionados para analizar las propiedades sensoriales en el momento de la recolección así como la evolución de los parámetros de calidad durante un periodo de almacenamiento refrigerado prolongado (ver apartado “Evolución de los parámetros de calidad durante el almacenamiento”). Con respecto al análisis sensorial, los panelistas dieron calificaciones significativamente ( $p < 0,05$ ) mayores para la apariencia, dulzor y firmeza de las cerezas tratadas con SaMe a concentración 1 mM si las comparamos con las cerezas control (Fig. 4), mientras que los resultados para acidez y color no fueron diferentes significativamente ( $p > 0,05$ ) entre los frutos tratados y control para ambas variedades. Estos resultados están de acuerdo con aquellos obtenidos para el tamaño del fruto, SST y firmeza, que se evaluaron mediante técnicas instrumentales de análisis objetivo. Además, no se detectaron sabores extraños en las cerezas procedentes de árboles tratados, mostrando que los tratamientos con SaMe no tuvieron efecto sobre las características de sabor del fruto.



**Fig. 4** Resultados del análisis sensorial realizado en la recolección, en experimentos de 2013, en frutos de 'Sweet Heart' (SH) y 'Sweet Late' (SL) procedentes de árboles control o tratados con salicilato de metilo 1 mM (SaMe). Las puntuaciones de los atributos de calidad clasificados desde 0 (pobre) hasta 5 (excelente). Los datos son la media  $\pm$  ES (grados de libertad = 18).

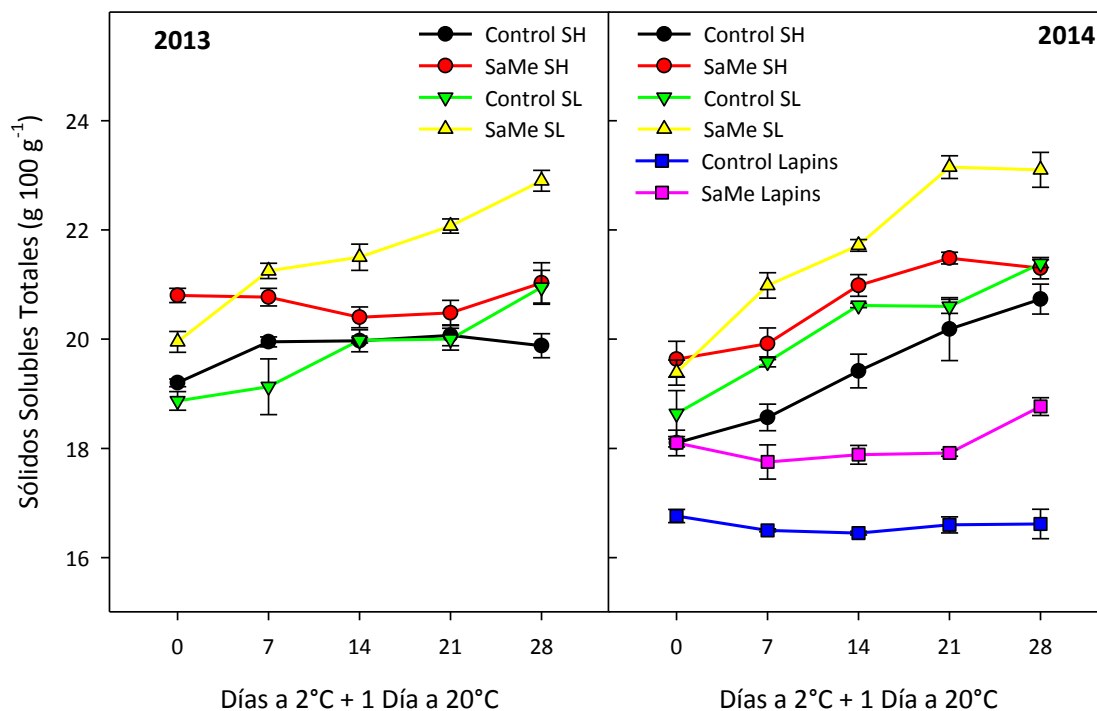
### 3.3. Evolución de los parámetros de calidad durante el almacenamiento

Debido a que hubo interacciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento (frutos tratados con SaMe 1 mM vs. frutos no tratados) en todas las variedades para los distintos parámetros de calidad, se estudió el efecto del tratamiento SaMe en cada fecha de muestreo. En la recolección, el índice de color ( $a^*/b^*$ ) fue significativamente mayor en frutos tratados que en frutos control (Fig. 5) para las tres variedades y ambos ciclos de crecimiento, manteniéndose las diferencias después de 28 días de almacenamiento a 2 °C + 1 día a 20 °C. Además, el índice de color de los frutos control y tratados aumentó desde el día 0 hasta el final del almacenamiento.



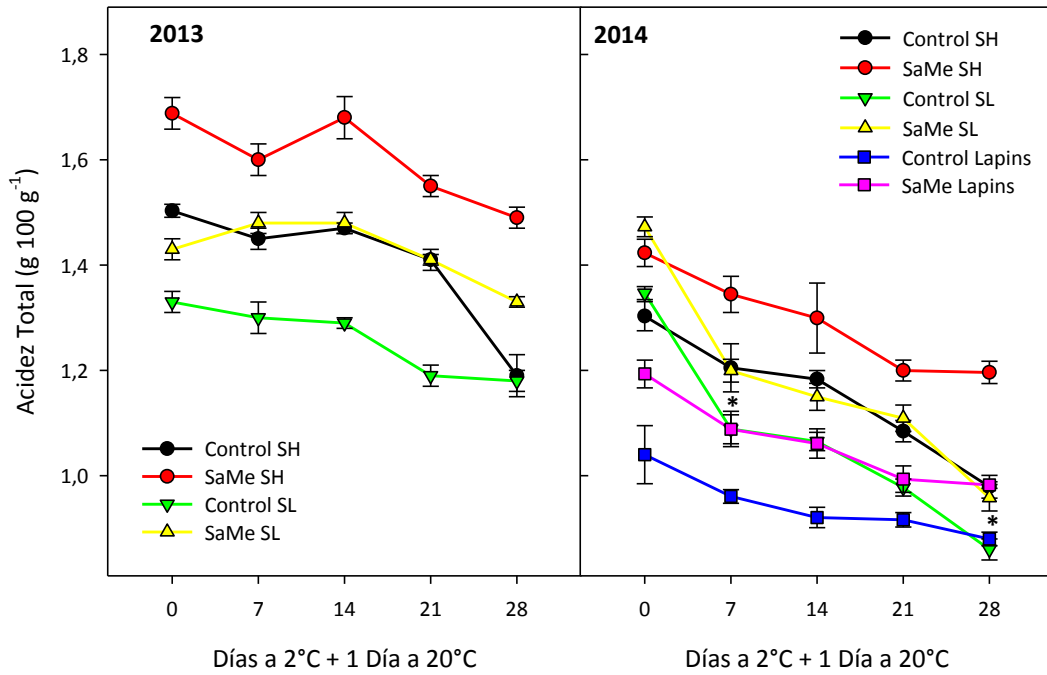
**Fig. 5** Evolución del color del fruto ( $a^*/b^*$ ) durante el almacenamiento para cerezas control y tratadas con salicilato de metilo 1 mM (SaMe) de las variedades 'Sweet Heart' (SH), 'Sweet Late' (SL) y 'Lapins', en experimentos de 2013 y 2014. Los datos son la media  $\pm$  ES (grados de libertad = 4).

De forma similar, el contenido en SST fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en frutos tratados que en los control en el momento de la recolección para todas las variedades y ambos ciclos de crecimiento y generalmente, estas diferencias se mantuvieron hasta el final del almacenamiento (Fig. 6). Durante el almacenamiento, los SST aumentaron de forma general en los frutos control y tratados de las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' para ambos años de experimento, 2013 y 2014, mientras que no se detectaron cambios en la variedad 'Lapins'.

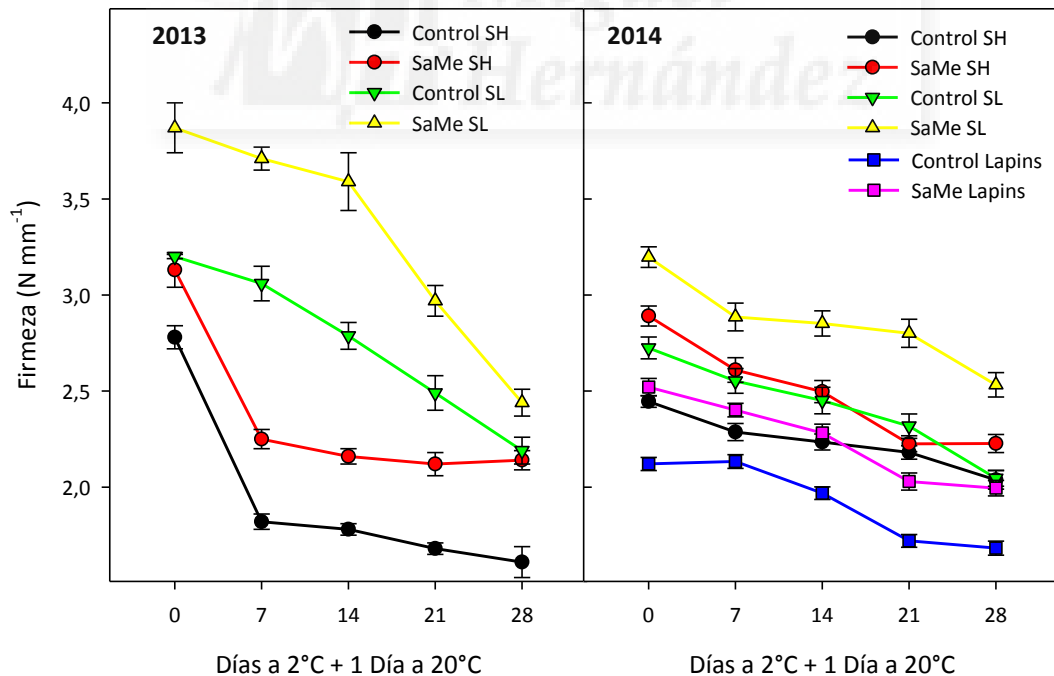


**Fig. 6** Evolución de sólidos solubles totales (SST, g 100 g<sup>-1</sup>) durante el almacenamiento en cerezas control y tratadas con salicilato de metilo 1 mM (SaMe) de las variedades 'Sweet Heart' (SH), 'Sweet Late' (SL) y 'Lapins', en experimentos de 2013 y 2014. Los datos son la media  $\pm$  ES (grados de libertad = 4).

Por el contrario, la AT disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en frutos control y tratados para todas las variedades y temporadas de crecimiento durante el almacenamiento post-cosecha (Fig. 7), aunque los valores de acidez fueron siempre mayores en cerezas tratadas que en cerezas control. Por otro lado, la firmeza del fruto también disminuyó durante el tiempo de almacenamiento tanto para frutos control como tratados, variedades y ciclos de crecimiento (Fig. 8), aunque los niveles de firmeza fueron siempre significativamente ( $p < 0,05$ ) mayores en cerezas tratadas que en cerezas control, y después el proceso de ablandamiento se vio significativamente retardado en las cerezas tratadas con SaMe dando lugar a frutos más firmes al final del almacenamiento. Teniendo en cuenta los resultados de pérdidas de AT y firmeza se podría deducir que la evolución del proceso de maduración post-cosecha se retrasó en cerezas tratadas con SaMe durante 1 o 2 semanas con respecto a las cerezas control.



**Fig. 7** Evolución de acidez total (AT, g 100 g<sup>-1</sup>) durante el almacenamiento para cerezas control y tratadas con salicilato de metilo 1 mM (SaMe) de las variedades 'Sweet Heart' (SH), 'Sweet Late' (SL) y 'Lapins', en experimentos de 2013 y 2014. Los datos son la media  $\pm$  ES (grados de libertad = 4).



**Fig. 8** Evolución de la firmeza del fruto (N mm<sup>-1</sup>) durante el almacenamiento para cerezas control y tratadas con salicilato de metilo 1 mM (SaMe) de las variedades 'Sweet Heart' (SH), 'Sweet Late' (SL) y 'Lapins', en experimentos de 2013 y 2014. Los datos son la media  $\pm$  ES (grados de libertad = 4).

Durante el almacenamiento post-cosecha de las cerezas se produjo un aumento significativo en el color y SST y una disminución en la firmeza y acidez, de acuerdo con publicaciones previas realizadas en otras variedades de cerezas (Serrano *et al.*, 2009), aunque para la evolución de SST se encontraron diferencias importantes dependiendo de la variedad y estado de madurez en la recolección. De este modo, los SST disminuyeron ligeramente en 'Ambrunes' (Alique *et al.*, 2005), 'Sciazza', y 'Ferrovia' (Esti *et al.*, 2002), permaneciendo sin cambios en 'Van' (Bernalte *et al.*, 2003), e incrementaron en 'Burlat' (Remón *et al.*, 2003) y en una amplia gama de variedades de cereza (Serrano *et al.*, 2009). El tratamiento con SaMe de cerezos tuvo efectos significativos sobre los parámetros de calidad, ya que se observó mayor color, SST, AT y firmeza en frutos tratados comparado con los controles en el momento de la recolección, y se mantuvieron más altos durante el periodo de almacenamiento. Por tanto, ya que estos parámetros son los atributos de calidad más importantes de cerezas y están relacionados con el sabor de las frutas recién cosechadas (Esti *et al.*, 2002; Bernalte *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2009) se puede inferir que el tratamiento con SaMe fue eficaz en el mantenimiento de las propiedades de calidad de las cerezas demandadas por los consumidores por más de una semana, si lo comparamos con las cerezas control.

No existe literatura disponible sobre el efecto de tratamientos pre-cosecha con SaMe en la evolución de la calidad del fruto durante el almacenamiento para poder comparar, y existe poca información sobre el efecto de tratamientos post-cosecha con SaMe. De este modo, en frutos sensibles a los daños por frío, tales como granada (Sayyari *et al.*, 2011) y mango (Han *et al.*, 2006), los tratamientos post-cosecha con SaMe disminuyeron los síntomas de daños por frío y redujeron el ablandamiento. En el caso de las granadas, el SaMe también dio lugar a mayores concentraciones en los compuestos antioxidantes (fenoles y antocianinas totales) y a mayor capacidad antioxidante (Sayyari *et al.*, 2011). Por otro lado, tratamientos pre-cosecha de naranjos con AS a 8 mM mantuvieron mayor AT y firmeza en naranjas durante el almacenamiento (Ahmad *et al.*, 2013). En uvas de mesa, tratamientos pre-cosecha con AS 2 mM mantuvieron mayor firmeza y retrasaron la maduración de las bayas durante 15 o 30 días de almacenamiento. Además, la combinación de tratamientos pre- y post-

cosecha con AS fue más efectiva en el mantenimiento de la calidad de las uvas de mesa que el tratamiento pre- o post-cosecha solo, ya que las bayas mejoraron la firmeza, tuvieron menores pérdidas de peso y mejor apariencia, tanto de las bayas como del raquis, durante el tiempo de almacenamiento (Khalil, 2014). Tratamientos post-cosecha con AS también mantuvieron mayor firmeza en *Annona squamosa* L. (Mo et al., 2008) y melocotón (Wang et al., 2006) durante el almacenamiento refrigerado. Especialmente en cerezas, tratamientos post-cosecha con AS o AAS retrasaron la pérdida de firmeza y acidez en dos variedades ('Cristalina' y 'Prine Giant'), con un incremento neto del periodo de vida útil (Valero et al., 2011). El mecanismo por el cual el SaMe retrasa el proceso de maduración post-cosecha en cerezas sigue siendo desconocido, aunque podría estar relacionado con un retraso en el proceso de maduración post-cosecha debido a un incremento de los niveles endógenos de AS inducido por el tratamiento con SaMe. En este sentido, el proceso de maduración en kiwi está correlacionado con una disminución en los niveles endógenos de AS, y la aplicación de AAS aumentó los niveles endógenos de AS y retrasó los cambios asociados con la maduración y senescencia tales como ablandamiento, actividad lipoxigenasa y la producción asociada de radicales libres superóxido (Zhang et al., 2003). Por otro lado, tanto las aplicaciones pre- como post-cosecha de AS indujeron la resistencia en cerezas a la podredumbre post-cosecha causada por *Monilia fructicola* (Yao y Tian, 2005) y *Penicillium expansum* (Xu y Tian, 2008). En nuestro caso, no se observaron síntomas de podredumbre en frutos control o tratados durante el periodo de almacenamiento, ni en los experimentos de 2013 ni en los de 2014 y por tanto, no se puede evaluar el posible efecto del tratamiento SaMe sobre la inducción de la resistencia de los frutos a la podredumbre microbiana.

#### **4. CONCLUSIONES**

En conclusión, se obtuvo una mejora de la calidad de las cerezas en el momento de la recolección mediante los tratamientos de cerezos con SaMe, ya que aumentaron los parámetros relacionados con la aceptación de las cerezas por parte de los consumidores (principalmente tamaño, color, firmeza y contenido en SST). Además, el proceso de maduración post-cosecha se retrasó en frutos procedentes de árboles

tratados y se mantuvieron en mayores niveles algunos parámetros de calidad importantes, tales como AT y firmeza, durante el almacenamiento post-cosecha en los frutos tratados. Por tanto, teniendo en cuenta que el SaMe es una sustancia natural considerada como GRAS (generalmente reconocida como segura), los tratamientos pre-cosecha con SaMe 1 mM en tres fechas clave de los estados de desarrollo de las cerezas, podrían ser considerados como un herramienta segura y respetuosa con el medio ambiente para mejorar la calidad del fruto en el momento de la recolección y durante el almacenamiento. En el futuro, el impacto de estos tratamientos sobre los compuestos bioactivos y actividad antioxidante merecen más estudios de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y la Comisión Europea con fondos FEDER a través del Proyecto AGL2012-35402/ALI. Juan Moral tiene una beca post-doctoral “Juan de la Cierva” del MEC. Agradecemos la valiosa ayuda de “Fincas Toli S.L.” por la provisión de cerezas y el asesoramiento técnico recibido durante los experimentos de 2013 y 2014, así como de “Cerezas Aitana” durante los experimentos de 2014. Asimismo, agradecemos a Oliver Pérez Howell MSc la lectura del manuscrito y la corrección del inglés.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad S., Singh Z., Iqbal Z. 2013. Effect of preharvest sprays of salicylic acid on the shelf life and quality of ‘Lane Late’ sweet orange (*Citrus sinensis* L.) cold storage. *Acta Hort.* 1012, 103-112.
- Ali I., Abbasi N.A., Hafiz I.A. 2014. Physiological response and quality attributes of peach fruit cv. Florida King as affected by different treatments of calcium chloride, putrescine and salicylic acid. *Pakistan J. Agri. Sci.* 51, 33-39.



- Alique R., Zamorano J.P., Martínez M.A., Alonso J. 2005. Effect of heat and cold treatments on respiratory metabolism and shelf life of sweet cherry, type picota cv "Ambrunés". *Postharvest Biol. Technol.* 35, 153-165.
- Ballistreri G., Continella A., Gentile A., Amenta M., Fabroni S., Rapisarda P. 2013. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem.* 140, 630-638.
- Bernalte M.J., Sabio E., Hernández M.T., Gervasini C. 2003. Influence of storage delay on quality of 'Van' sweet cherry. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 303-312.
- Díaz-Mula H.M., Castillo S., Martínez-Romero D., Valero D., Zapata P.J., Guillén F., Serrano M. 2009. Organoleptic, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Sci. Technol. Int.* 15, 535-543.
- Einhorn T.C., Wang Y., Turner J. 2013. Sweet cherry fruit firmness and postharvest quality of late-maturing cultivars are improved with low-rate, single applications of gibberellic acid. *HortSci.* 48, 1010-1017.
- El-Razek E.A., Hassan H.S.A., El-Din K.M.G. 2013. Effect of foliar application with salicylic acid, benzyladenine and gibberellic acid on flowering, yield and fruit quality of olive trees (*Olea europaea* L.). *Middle-East J. Sci. Res.* 14, 1401-1406.
- Elwan M.W.M., El-Hamahmy M.A.M. 2009. Improved productivity and quality associated with salicylic acid application in greenhouse pepper. *Sci. Hortic.* 112, 521-526.
- Esti M., Cinquante L., Sinesio F., Moneta E., Matteo M. 2002. Physicochemical and sensory fruit characteristic of two sweet cherry cultivars after cold storage. *Food Chem.* 76, 399-405.
- Fung R.W.M., Wang C.Y., Smith D.L., Gross K.C., Tao Y., Tian M. 2006. Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 163, 1049-1060.
- Giménez M.J., Valverde J.M., Valero D., Guillén F., Martínez-Romero D., Serrano M., Castillo S. 2014. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chem.* 160, 226-232.

- Han J., Tian S.P., Meng X.H., Ding Z.H. 2006. Response of physiologic metabolism and cell structures in mango fruits to exogenous methyl salicylate under low temperature stress. *Physiol. Plant.* 128, 125-133.
- Hayat S., Ahmad A. 2007. *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Dordrecht, Springer.
- Hendricks, D., Hoffman, E., Lötze, E., 2015. Improving fruit quality and tree health of *Prunus persica* cv. 'Sandvliet' through combined mineral and salicylic acid foliar applications. *Sci. Hortic.* 187, 65-71.
- Huang R., Xia R., Lu Y., Hu, L., Xu Y. 2008. Effect of preharvest salicylic acid spray treatment on post-harvest antioxidant in the pulp and peel of 'Cara cara' navel oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Sci. Food Agric.* 88, 229-236.
- ISO 4121:2003. Sensory analysis-Guidelines for the use of quantitative response scales.
- Khalil H.A. 2014. Effects of pre- and postharvest salicylic acid application on quality and shelf life of 'Flame Seedless' grapes. *Eur. J. Hortic. Sci.* 79, S8-15.
- Martínez-Esplá A., Zapata P.J., Valero D., García-Viguera, C., Castillo, S., Serrano, M. 2014. Preharvest application of oxalic acid increased fruit size, bioactive compounds, and antioxidant capacity in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* 62, 3432-3437.
- Mo Y., Gong D., Liang G., Han R., Xie J., Li W. 2008. Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 88, 2693-2699.
- Raskin I. 1992. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol*, 99, 799-803.
- Remón S., Venturini M.E., López-Buesa P., Oria R. 2003. Burlat cherry quality after long range transport: optimisation of packaging conditions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4, 425-434.
- Sayyari M., Babalar M., Kalantari S., Martínez-Romero D., Guillén F., Serrano M., Valero D. 2011. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chem.* 124, 964-970.
- Serradilla M.J., Martín A., Ruiz-Moyano S., Hernández A., López-Corrales M., Córdoba M.D.G. 2012. Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain). *Food Chem.*, 133, 1551-1559.

- Serrano M., Díaz-Mula H.M., Zapata P.J., Castillo S., Guillén F., Martínez-Romero D., Valverde J.M., Valero, D. 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *J. Agric. Food Chem*, 57, 3240-3246.
- Serrano M., Guillén F., Martínez-Romero D., Castillo S., Valero D. 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2741-2745.
- Valero D., Díaz-Mula H.M., Zapata P.J., Castillo S., Guillén F., Martínez-Romero D., Serrano M. 2011. Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 5483-5489.
- Valero D, Serrano M. 2010. *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*. Boca Raton, USA, CRC-Taylor & Francis.
- Vlot A.C., Dempsey M.A., Klessig D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 47, 177-206.
- Wang L., Chen S., Kong W., Li S., Archbold D.D. 2006. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 41, 244-251.
- Xu X., Tian S. 2008. Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 379-385.
- Yao H., Tian S. 2005. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 35, 253-262.
- Zhang Y, Chen K, Zhang S, Ferguson I. 2003. The role of salicylic acid in postharvest ripening of kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 67-74.
- Zhang C., Whiting M. 2011. Pre-harvest foliar application of prohexadione-Ca and gibberellins modify canopy source-sink relations and improve quality and shelf-life of 'Bing' sweet cherry. *Plant Growth Regul.* 65, 145-156.



---

# PUBLICACIÓN 2

---

## TRATAMIENTOS DE CEREZOS CON SALICILATO DE METILO INCREMENTAN LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES DE LOS FRUTOS EN LA COSECHA Y DURANTE EL ALMACENAMIENTO

---

Juan Miguel Valverde<sup>a</sup>, M. José Giménez<sup>a</sup>, Fabián Guillén<sup>a</sup>, Daniel Valero<sup>a</sup>, Domingo Martínez-Romero<sup>a</sup>, María Serrano<sup>b,\*</sup>

a Departamento de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

b Departamento de Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

---

***Postharvest Biology and Technology 109: 106-113 (2015)***

## Tratamientos de cerezos con salicilato de metilo incrementan los sistemas antioxidantes de los frutos en la cosecha y durante el almacenamiento

Juan Miguel Valverde<sup>a</sup>, M. José Giménez<sup>a</sup>, Fabián Guillén<sup>a</sup>, Daniel Valero<sup>a</sup>, Domingo Martínez-Romero<sup>a</sup>, María Serrano<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

<sup>b</sup> Departamento de Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España

### RESUMEN

Se trataron cerezos (*Prunus avium* L.) con salicilato de metilo (SaMe) 1 mM en tres puntos clave del desarrollo del fruto en el árbol para analizar el efecto del SaMe sobre los compuestos bioactivos, actividad antioxidante total (AAT) y enzimas antioxidantes en el momento de la recolección y durante los 28 días de almacenamiento. Los experimentos se realizaron durante dos años consecutivos, usando dos variedades de cereza 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' en 2013 y otra variedad adicional 'Lapins' en 2014. Tanto los fenoles totales como el contenido en antocianinas fueron significativamente mayores en los frutos tratados con SaMe que en los controles en el momento de la recolección y durante el almacenamiento, dando lugar a frutos con mayor AAT-hidrosoluble. La actividad de enzimas antioxidantes catalasa (CAT), peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) disminuyó durante el almacenamiento en todas las variedades y años de experimento, aunque los frutos tratados con SaMe mostraron mayor actividad de estas enzimas antioxidantes que los controles. Por ello, los tratamientos de cerezos con SaMe podrían aumentar las propiedades beneficiosas para la salud del consumo de cerezas, debido a su efecto sobre el incremento de compuestos antioxidantes y bioactivos, con efectos adicionales en retrasar el proceso de senescencia post-recolección del fruto, mediante el incremento de la actividad de enzimas involucradas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

© 2015 Publicado por Elsevier B.V.

**Palabras clave:** antocianinas, ascorbato peroxidasa, catalasa, peroxidasa, fenoles, senescencia post-recolección, superóxido dismutasa.

## 1. INTRODUCCIÓN

El salicilato de metilo (SaMe) es un compuesto volátil de las plantas sintetizado a partir del ácido salicílico que juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de la planta, en los mecanismos de defensa de la planta, las respuestas contra diversos estreses abióticos, así como en el proceso de maduración del fruto (Hayat y Ahmad, 2007; Kumar, 2014). Así, tratamientos post-recolección con SaMe exógeno disminuyeron los daños por frío en tomate (Fung et al., 2006), pimiento (Fung et al., 2004) y mango (Hang et al., 2006), mediante la protección de la estructura de la pared celular y membranas celulares de la disfunción causada por los daños por peroxidación lipídica. Del mismo modo, en granadas, tratamientos post-recolección con SaMe redujeron significativamente los síntomas de daños por frío, debido al mantenimiento de la estructura de la membrana y de su permeabilidad selectiva, dando lugar a menores pérdidas de electrolitos. Además, también se mantuvieron otros parámetros relacionados con la calidad de los frutos, tales como firmeza, sólidos solubles totales y acidez total en los frutos tratados con SaMe, mientras que se produjeron pérdidas significativas en las granadas control (Sayyari et al., 2011a). Además, incrementó el contenido en polifenoles totales y antocianinas totales, así como la actividad antioxidante en arilos durante el almacenamiento, aunque estos incrementos fueron significativamente mayores en granadas tratadas con SaMe que en granadas control. Así pues, el SaMe tiene aplicaciones post-recolección potenciales para reducir los daños por frío, mantener la calidad, y mejorar los beneficios saludables relacionados con el consumo de granadas, debido al incremento de su capacidad antioxidante y compuestos bioactivos (Sayyari et al., 2011a; Valero et al., 2015).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical peróxido ( $O_2^{\bullet-2}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidróxilo ( $OH^{\bullet}$ ), son generados inevitablemente en las células de las plantas como consecuencia normal del metabolismo, principalmente en reacciones catalizadas por oxidasas y lipoxigenasa y en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. El contenido en ROS en las células de las plantas es dependiente de sus sistemas de producción y mecanismos de eliminación, enzimáticos y no enzimáticos (Apel y Hirt, 2004). Entre los sistemas no enzimáticos se encuentran

compuestos antioxidantes como formas reducidas de ascorbato y glutatión, tocoferoles, fenoles, alcaloides y carotenoides, mientras que los mecanismos de eliminación enzimáticos incluyen principalmente superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX). SOD detoxifica radicales libres de  $O_2^{\bullet-}$  mediante su conversión en  $H_2O_2$  y  $O_2$ , y el  $H_2O_2$  es eliminado por CAT, APX y POD. CAT cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, mientras que la APX utiliza ascorbato y  $H_2O_2$  como sustratos produciendo agua y dehidroascorbato como productos, siendo este último convertido en ascorbato por la enzima glutatión reductasa. Además,  $H_2O_2$  puede ser también reducido a agua por la POD, mediante el uso de fenoles y otras moléculas orgánicas como donantes de electrones. Sin embargo, a pesar de la presencia de estos eficientes sistemas antioxidantes, todavía se producen daños oxidativos en las células de las plantas debido a la producción incontrolable de ROS o a una ineficiente eliminación. Por consiguiente, ya que el proceso de maduración del fruto se considera como una forma modificada de senescencia, asociada a la acumulación de ROS (Hodges et al., 2004), la presencia de un alto contenido de compuestos antioxidantes y una elevada actividad de enzimas antioxidantes podrían conducir a un retraso del proceso de maduración post-recolección del fruto y a mantener sus atributos de calidad durante largos periodos (Mondal et al., 2009; Kumar et al., 2014).

En este sentido, en frutos como mango y *Annona squamosa* L., se ha demostrado que tratamientos post-recolección con ácido salicílico (AS) dieron lugar a una menor producción de radicales libres superóxido y actividad lipoxigenasa y a incrementos en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y APX durante el almacenamiento en comparación con los frutos control (Ding et al., 2007; Mo et al., 2008). También se observaron incrementos similares en estas enzimas antioxidantes en melocotón tras realizar tratamientos post-cosecha con AS (Tareen et al., 2012). Incluso en cerezas, tratamientos con AS tres días antes de la recolección o tratamientos post-recolección aumentaron la actividad POD y aumentaron sus niveles transcripcionales, los cuales estaban relacionados con la reducción del ataque fúngico encontrado en los frutos tratados con AS, especialmente cuando AS se aplicó en los frutos en estados tempranos de madurez (Yao y Tian, 2005; Chan et al., 2008).



En estudios previos, hemos encontrado que tratamientos post-cosecha de cerezas con AS o AAS, análogos cercanos al SaMe, retrasaron el proceso de maduración post-cosecha, manifestado por menores cambios de color y menores pérdidas de acidez y firmeza, y mantuvieron mayor contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante durante el almacenamiento si lo comparamos con los controles (Valero et al., 2011). Además, tratamientos de cerezos con AS o AAS, mediante pulverización foliar, durante el crecimiento y maduración del fruto en el árbol, incrementaron el peso del fruto y atributos de calidad (tales como color y firmeza) en la recolección comercial, además de la concentración de fenoles totales y antocianinas, dando lugar a frutos con mayor actividad antioxidante, tanto en la fracción lipo- como hidrosoluble (Giménez et al., 2014). Por otro lado, tratamientos similares de cerezos con SaMe también incrementaron el tamaño del fruto y otras propiedades de calidad, tales como firmeza y SST, en el momento de la recolección, mostrando también un efecto significativo en el mantenimiento de las propiedades organolépticas de la cerezas durante el almacenamiento (Giménez et al., datos no publicados). Sin embargo, hasta donde conocemos, no existe literatura científica disponible sobre los posibles efectos de tratamientos con SaMe, ni en aplicaciones pre- ni en post-cosecha, sobre los sistemas antioxidantes de las cerezas.

Por tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar por primera vez el efecto del tratamiento de cerezos con SaMe sobre los compuestos antioxidantes y la actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT, POD y APX, en las cerezas, tanto en el momento de la recolección como durante el almacenamiento refrigerado. Para conseguir estos objetivos, los experimentos se realizaron en dos años consecutivos, 2013 y 2014, usando dos y tres variedades de cereza, respectivamente.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal y diseño experimental**

Los experimentos se realizaron en dos años consecutivos, en el periodo primavera-verano de 2013 y 2014. En 2013, se usaron dos variedades de cerezas, 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', cultivadas en una explotación comercial de "Fincas Toli S.L" localizada en Jumilla (38.473800N, -1.323861O, Murcia, España) y en 2014 se usó

una variedad adicional 'Lapins', cultivada en una explotación comercial "Cerezas Aitana" localizada en Alcoy (38.780634 N, -0.443124 O, Alicante, España). Ambos lugares presentan unas condiciones ambientales y climáticas similares, y los cerezos se cultivaron con prácticas de cultivo similares. Todas las variedades se injertaron sobre un patrón 'Santa Lucía 64' y se plantaron en un marco de plantación de 3 x 4 m. Se seleccionaron tres árboles completamente al azar para cada variedad y tratamiento: control (agua destilada) y SaMe 1 mM. Esta concentración de SaMe mostró ser la más apropiada en términos de incrementar atributos de calidad del fruto (Giménez et al., datos no publicados). Se aplicaron soluciones recién preparadas (conteniendo un 0,5 % de Tween 20) mediante pulverización foliar con un pulverizador mecánico (7,5 L/árbol) y repetido en 3 fechas clave del ciclo de crecimiento, que se correspondían con eventos clave en el proceso de desarrollo del fruto, de acuerdo con experimentos previos (Díaz-Mula et al., 2009; Giménez et al., 2014): T1 (lignificación del hueso), T2 (cambios de color iniciales) y T3 (inicio de la maduración). Las cerezas se recolectaron en el estado de madurez comercial que se correspondió con el estado S2 según Serrano et al. (2009), e inmediatamente se trasladaron al laboratorio. Después, se seleccionaron 90 frutos de cada árbol o réplica, homogéneos en color y tamaño y sin defectos visuales, variedad, año y tratamiento y agrupados al azar en 3 lotes de 30 frutos, y se almacenaron en una cámara de refrigeración en atmósfera normal a 2 °C y HR del 85 %. Se tomó un lote al azar para cada réplica después de 0, 14 y 28 días de almacenamiento refrigerado y se mantuvo durante 1 día a 20 °C y HR del 70 %, después del cual se realizaron las determinaciones analíticas. La porción comestible del fruto para cada lote se cortó en pequeñas piezas para obtener una muestra homogénea, se congeló en N<sub>2</sub> líquido, se mezcló y se almacenó a -20 °C para la posterior determinación, por duplicado en cada muestra, de antocianinas totales, fenoles totales, actividad antioxidante (tanto en la fracción hidrosoluble como liposoluble) y actividad de las enzimas SOD, CAT, POD y APX.

## 2.2. Determinación de fenoles totales, antocianinas totales, carotenoides totales y actividad antioxidante total

La extracción de fenoles se realizó usando 2 g de tejido congelado y 10 mL de agua: metanol (2:8) conteniendo FNa 2 mM (para inactivar la actividad de la polifenoloxidasas y prevenir la degradación fenólica) como se describió previamente (Serrano et al., 2009) y se cuantificaron usando el reactivo Folin-Ciocalteu. Los resultados (media  $\pm$  ES) fueron expresados como mg ácido gálico equivalentes (GAE) 100 g<sup>-1</sup> peso fresco. Las antocianinas totales se extrajeron y determinaron según publicaciones previas (Serrano et al., 2005) y se calcularon como cianidín 3-glucósido equivalentes (CGE, coeficiente de absorción molar de 29.600 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> y peso molecular de 449,2 g mol<sup>-1</sup>) y los resultados (media  $\pm$  ES) se expresaron como mg 100 g<sup>-1</sup> peso fresco. Los carotenoides totales se extrajeron de acuerdo con Valero et al. (2011). Brevemente, se extrajeron los carotenoides de 2 g de cereza con acetona y agitados con éter dietílico y 10 % ClNa para la separación de las dos fases. La fase liposoluble se lavó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 %), fue saponificada con 10 % KOH en metanol, y los pigmentos se extrajeron posteriormente con éter dietílico, el cual se evaporó y después el residuo seco se diluyó y se enrasó con acetona hasta 25 mL. Los carotenoides totales fueron estimados mediante la lectura de absorbancia a 450 nm y se expresaron como mg de  $\beta$ -caroteno equivalentes ( $\beta$ -CE) 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco, teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar  $\epsilon$ = 2.560 y los resultados fueron la media  $\pm$  ES.

La actividad antioxidante total (AAT) se cuantificó de acuerdo con Serrano et al. (2009) mediante la homogeneización de 2 g de tejido en 10 mL de tampón fosfato 50 mM pH= 7,8 y 3 mL de acetato de etilo, y después se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La fase superior se usó para determinar la AAT debida a los compuestos liposolubles (AAT-L) y la fase inferior para la actividad antioxidante total debida a los compuestos hidrosolubles (AAT-H), en un medio de reacción conteniendo 50  $\mu$ L de extracto, cromóforo 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) 2 mM, 15  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y 25  $\mu$ M de la enzima peroxidasa (HRP) en tampón fosfato-Na 50 mM (pH=7,8) o metanol, para AAT-H y AAT-L respectivamente, en un volumen total de 1 mL. Se realizó una curva de calibrado con Trolox (ácido (R)-(+)-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-

tetrametil-croman-2-carboxílico) (0-20 nmol) de Sigma (Madrid, España), y los resultados (media  $\pm$  ES) se expresaron como mg de Trolox equivalentes (TE) 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco.

### 2.3. Enzimas antioxidantes

Para obtener el extracto para el análisis de enzimas SOD, CAT, APX y POD se homogeneizaron 5 g de muestra congelada con 10 mL de tampón fosfato 50 mM, pH=7 conteniendo 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP) y ácido etildiaminotetraacético 1 mM (EDTA). El homogeneizado se centrifugó a 15.000 x g durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para realizar los ensayos enzimáticos. La enzima POD se determinó según publicaciones previas (Zapata et al., 2014), en una mezcla de reacción conteniendo tampón fosfato 50 mM pH=7,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12 mM, guayacol 14 mM y 100  $\mu$ L de extracto enzimático en un volumen total de 3 mL. Se midió el incremento de absorbancia a 470 nm, debido a la oxidación del guayacol, durante 1 minuto. Una unidad enzimática (U) fue definida como el incremento de absorbancia de 0,01 por minuto, y la actividad peroxidasa se expresó como U min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. Para la actividad de las enzimas CAT y APX, se usó el protocolo descrito por Zhang et al. (2013). En resumen, para CAT, se añadieron 100  $\mu$ L de extracto a 2,9 mL de una mezcla de reacción conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM y tampón fosfato 50 mM pH=7,0. La degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue medida por la disminución de absorbancia a 240 nm durante 1 min. Una unidad enzimática (U) fue definida como la disminución de 0,01 de absorbancia por minuto, y la actividad CAT se expresó como U min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. Para la cuantificación de APX la mezcla de ensayo contenía tampón fosfato 50 mM pH= 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. Se midió el descenso de absorbancia a 290 nm durante 1 min. Una unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de ascorbato por minuto, y la actividad APX se expresó como U min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. La actividad de la enzima SOD se determinó fotoquímicamente como se describió en Zhang et al. (2013) con pequeñas modificaciones. La solución de reacción contenía tampón fosfato 50 mM, pH 7,8, metionina 5 mM, EDTA 100  $\mu$ M y 65  $\mu$ M cloruro de nitrobluetetrazolium (NBT). A 2,9 mL de esta solución se añadieron 25  $\mu$ L de extracto de enzima y 40  $\mu$ L de riboflavina 0,15 mM. Se pusieron los tubos en un

incubador de luz fluorescente (40 W, 10 min), y se midió la formación de formazan azul a 560 nm de absorbancia. Una unidad (U) de actividad de SOD es definida como la cantidad de enzima que causa el 50 % de inhibición de reducción de NBT bajo las condiciones de ensayo. Los resultados se expresaron como U mg proteína<sup>-1</sup>. Para todas las enzimas con actividad antioxidante los resultados son la media  $\pm$  SE. El contenido de proteínas totales en el extracto enzimático fue cuantificado de acuerdo con Bradford (1976).

#### **2.4. Análisis estadístico**

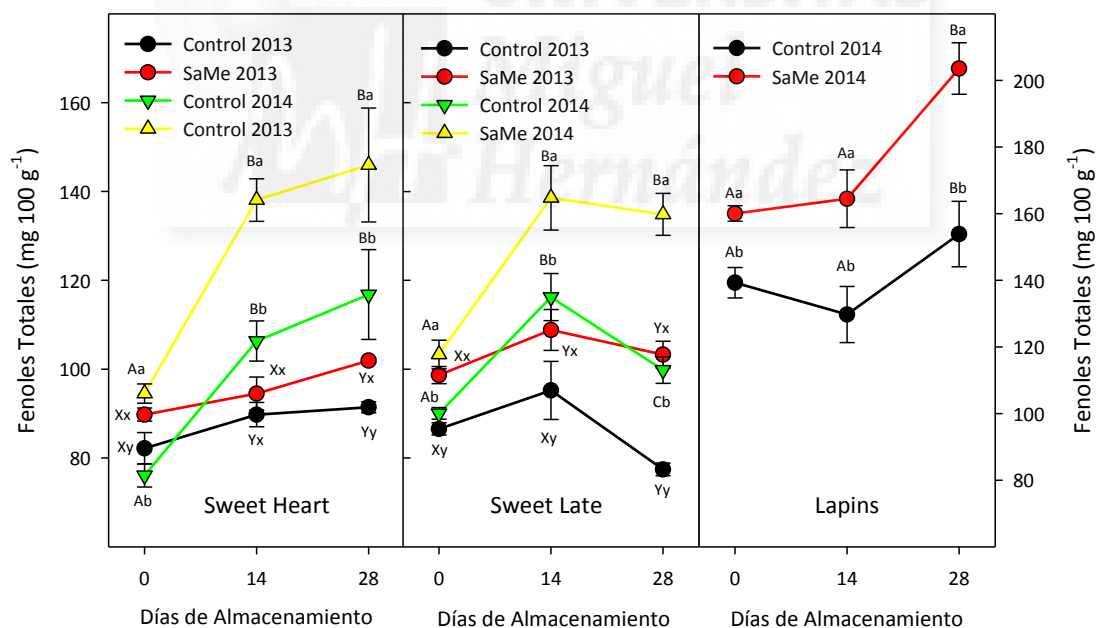
Los experimentos se llevaron a cabo usando un diseño completamente aleatorizado. Los datos para cada variedad y año se sometieron, de forma independiente, a análisis de varianza (ANOVA). Las fuentes de variación para cada variedad y año fueron tratamiento y tiempo de almacenamiento. Se realizó una comparación de medias usando el test HSD de Duncan de comparación múltiple, para determinar si existían diferencias significativas a  $p < 0,05$ . Todos los análisis se realizaron con el software SPSS v. 22.0 para Windows (SPSS, 2011). Las correlaciones se realizaron entre la AAT-H y antocianinas totales o fenoles totales y entre AAT-L y concentración de carotenoides.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. Fenoles, antocianinas y actividad antioxidante**

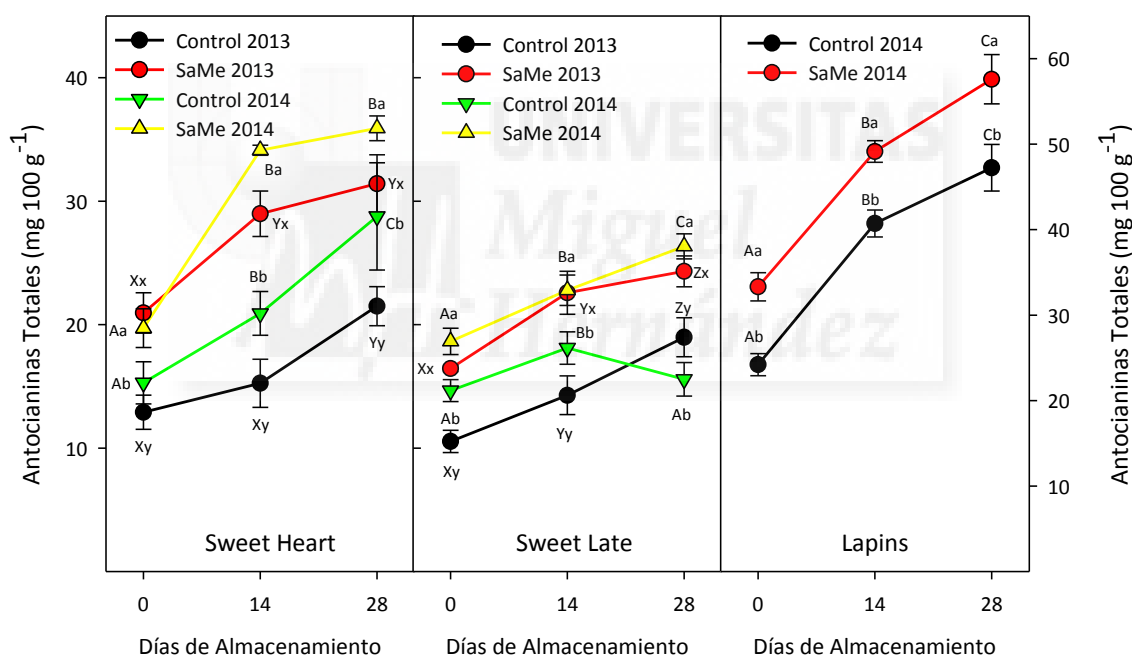
Estudios previos han demostrado que la concentración de fenoles totales en cerezas incrementa durante las últimas semanas de desarrollo del fruto en el árbol, alcanzando valores finales que oscilan entre los 80 y 200 mg 100 g<sup>-1</sup>, dependiendo de la variedad, estado de madurez, prácticas agronómicas y condiciones ambientales (Serrano et al., 2005; Usenik et al., 2008; Díaz-Mula et al., 2009; Ballistreri et al., 2013). Como se muestra en la Fig. 1 la concentración de fenoles en la cosecha en frutos control fue similar en las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' en ambos años, 2013 y 2014 ( $\approx 75$ -80 mg 100 g<sup>-1</sup>), mientras que en la variedad 'Lapins' la concentración fue

dos veces mayor ( $\approx 140 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), mostrando que esta variedad tenía un elevado contenido en fenoles si la comparamos con otras (Díaz-Mula et al., 2009; Serradilla et al., 2012). Sin embargo, en las cerezas tratadas con SaMe la concentración de fenoles fue significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que en los controles, en las tres variedades y para ambos años de ensayo. La concentración fenólica incrementó en los frutos control durante el almacenamiento, aunque en la variedad 'Sweet Late' se produjo un descenso después del almacenamiento prolongado, lo cual puede ser atribuido a los procesos de sobre-maduración y senescencia en esta variedad, como se publicó previamente para otras variedades de cereza (Gonçalves et al., 2004; Serrano et al., 2009; Valero et al., 2011). Sin embargo, en cerezas tratadas la concentración de fenoles totales fue significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que en los frutos control durante el periodo de almacenamiento, en las tres variedades y en los dos años estudiados.



**Fig.1.** Concentración de fenoles totales en cerezas control y tratadas con salicilato de metilo (SaMe) de las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', para los años de experimento 2013 y 2014 (eje izquierdo), y de la variedad 'Lapins' para el experimento de 2014 (eje derecho), durante el almacenamiento a 2 °C + 1 día a 20 °C. Los datos son la media  $\pm$  ES. Las letras minúsculas distintas muestran diferencias significativas entre los frutos control y tratados para cada fecha de muestreo en 2013 (x, y) y en 2014 (a, b), mientras que las letras mayúsculas muestran diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento en 2013 (X, Y), y en 2014 (A, B, C).

Se encontró un patrón similar al observado para los componentes fenólicos totales en el contenido en antocianinas totales (Fig.2), es decir, incrementó durante el almacenamiento en los frutos control y tratados para todas las variedades y años de experimento, excepto para los frutos control de 'Sweet Late' en el año 2014, en el cual el contenido en antocianinas aumentó durante los primeros 14 días y después disminuyó durante el resto del almacenamiento. Aun así, como se comentó anteriormente para el contenido fenólico, los tratamientos pre-cosecha con SaMe dieron lugar a frutos con una concentración de antocianinas significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor, en el momento de la cosecha y durante el almacenamiento, en las tres variedades de cereza y para ambos años de experimento.



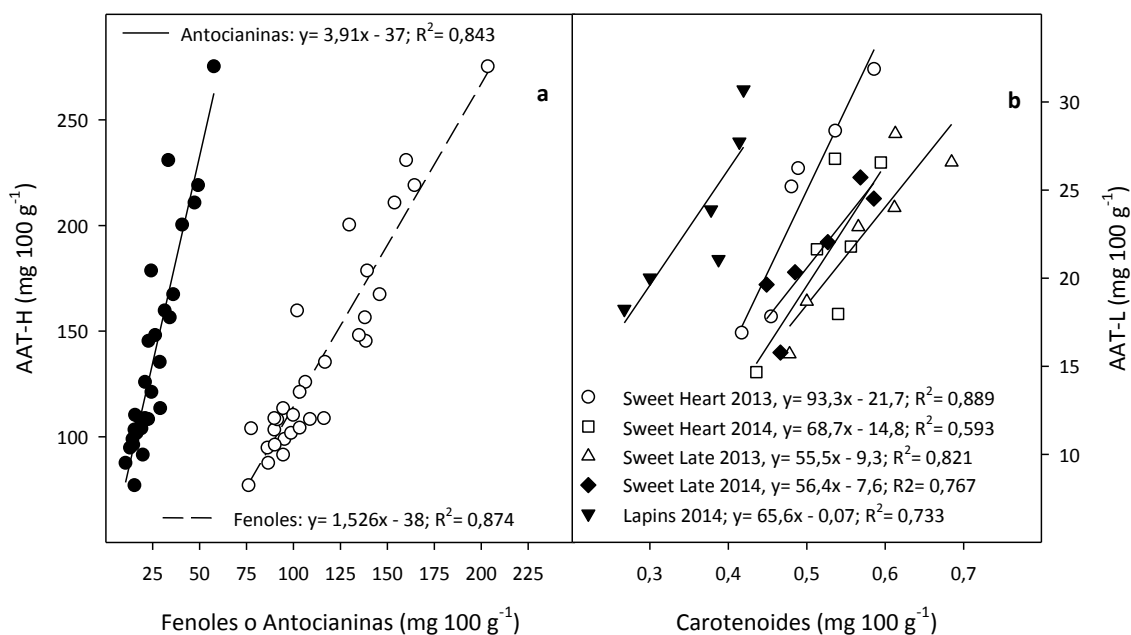
**Fig. 2.** Concentración de antocianinas totales en cerezas control y tratadas con salicilato de metilo (SaMe) de las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', para los años de experimento 2013 y 2014 (eje izquierdo), y de la variedad 'Lapins' para el experimento de 2014 (eje derecho), durante el almacenamiento a 2 °C + 1 día a 20 °C. Los datos son la media  $\pm$  ES. Las letras minúsculas distintas muestran diferencias significativas entre los frutos control y tratados para cada fecha de muestreo en 2013 (x, y) y en 2014 (a, b), mientras que las letras mayúsculas muestran diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento en 2013 (X, Y), y en 2014 (A, B, C).

No hay estudios previos disponibles del efecto de tratamientos pre-cosecha con SaMe sobre los compuestos bioactivos para poder comparar, aunque sí existen algunas evidencias con tratamientos post-cosecha. De este modo, en granada los tratamientos post-cosecha con SaMe (a 0,1 o 0,01 mM) aumentaron significativamente los fenoles totales y las antocianinas, con respecto a los controles, durante largos periodos de almacenamiento (Sayyari et al., 2011a). Se obtuvieron resultados similares en granadas tratadas con AAS, un análogo al SaMe (Sayyari et al., 2011b). Por otro lado, tratamientos post-cosecha de cerezas con AS o AAS, dieron lugar a frutos con mayor concentración fenólica y antocianinas durante el almacenamiento, si lo comparamos con aquellos encontrados en las cerezas control (Valero et al., 2011). Del mismo modo, el tratamiento post-cosecha de cereza cornelian con AS 1 o 2 mM incrementó los fenoles totales, flavonoides y antocianinas, debido al efecto de AS sobre la inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual cataliza los primeros pasos en la ruta de los fenilpropanoides y por tanto está involucrada en la biosíntesis de compuestos fenólicos, tales como flavonoides, antocianidinas y fenilpropanoides (Dokhanieh et al., 2013). Se han publicado incrementos similares del contenido fenólico, vía estimulación de la actividad PAL, después de tratamientos post-cosecha con AS en albaricoque (Wang et al., 2015). Además, el tratamiento de uvas con AS indujo la acumulación de ARNm de la enzima PAL y la síntesis de nuevas proteínas PAL (Chen et al., 2006).

La actividad antioxidante total en los extractos hidrosolubles (AAT-H) también fue mayor en las cerezas tratadas con SaMe que en las cerezas control en el momento de la recolección, en las tres variedades de cereza y para ambos años de ensayo. La AAT-H incrementó a lo largo del almacenamiento y fue dos veces mayor en 'Lapins' que en 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' (datos no mostrados). De hecho, la AAT-H estuvo altamente correlacionada con las concentraciones de antocianinas totales ( $R^2= 0,843$ ) y de fenoles totales ( $R^2= 0,874$ ), teniendo en cuenta todos los datos de los años 2013 y 2014 de los frutos control y tratados de las tres variedades durante el almacenamiento (Fig.3). Estos resultados muestran que las antocianinas y otros fenoles podrían ser los principales compuestos hidrosolubles responsables de la actividad antioxidante de cerezas, de acuerdo con publicaciones previas (Díaz-Mula et al., 2009; Ballistreri et al.,



2013; Giménez et al., 2014). Por tanto, el SaMe es una molécula señal segura que podría aumentar la calidad nutricional y mejorar las propiedades beneficiosas para la salud del consumo de cerezas, dado el efecto que las antocianinas y otros fenoles tienen sobre la reducción del riesgo de padecer diversas enfermedades, como cáncer, diabetes, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (McCune et al., 2011; Norberto et al., 2013). Por otro lado, la AAT-L fue muy baja si la comparamos con la AAT-H y no se observó un efecto significativo del tratamiento con SaMe sobre la ella, ni en el momento de la recolección ni durante el almacenamiento (datos no mostrados). Por otra parte, la concentración de carotenoides en el momento de la cosecha fue  $\approx 0,45-0,50 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  en 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' para 2013 y 2014 y ligeramente inferior para 'Lapins' ( $\approx 0,40 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), sin encontrarse efectos significativos del tratamiento con SaMe, excepto para 'Sweet Heart' en 2014, en la cual la concentración de carotenoides en el momento de la recolección fue significativamente mayor que en los controles ( $0,54 \pm 0,02$  y  $0,43 \pm 0,01 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ , respectivamente). La concentración de carotenoides aumentó durante el almacenamiento en los frutos control y tratados en todas las variedades, aunque sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) atribuidas al tratamiento (datos no mostrados). Sin embargo, se encontró una elevada correlación entre la AAT-L y los carotenoides (Figura 3) en las tres variedades de cereza y en ambos ciclos de crecimiento, teniendo en cuenta los datos de los frutos control y tratados ( $R^2 = 0,593-0,889$ ), lo cual indicaría que los carotenoides son los principales compuestos bioactivos liposolubles que contribuye a la AAT-L. Sin embargo, dado que la AAT-L fue diez veces menor que la AAT-H, los principales componentes que contribuyen a la capacidad antioxidante de cerezas son los hidrosolubles, de acuerdo con publicaciones previas (Valero et al., 2011; Díaz-Mula et al., 2012), que aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) debido a tratamientos pre-cosecha con SaMe.

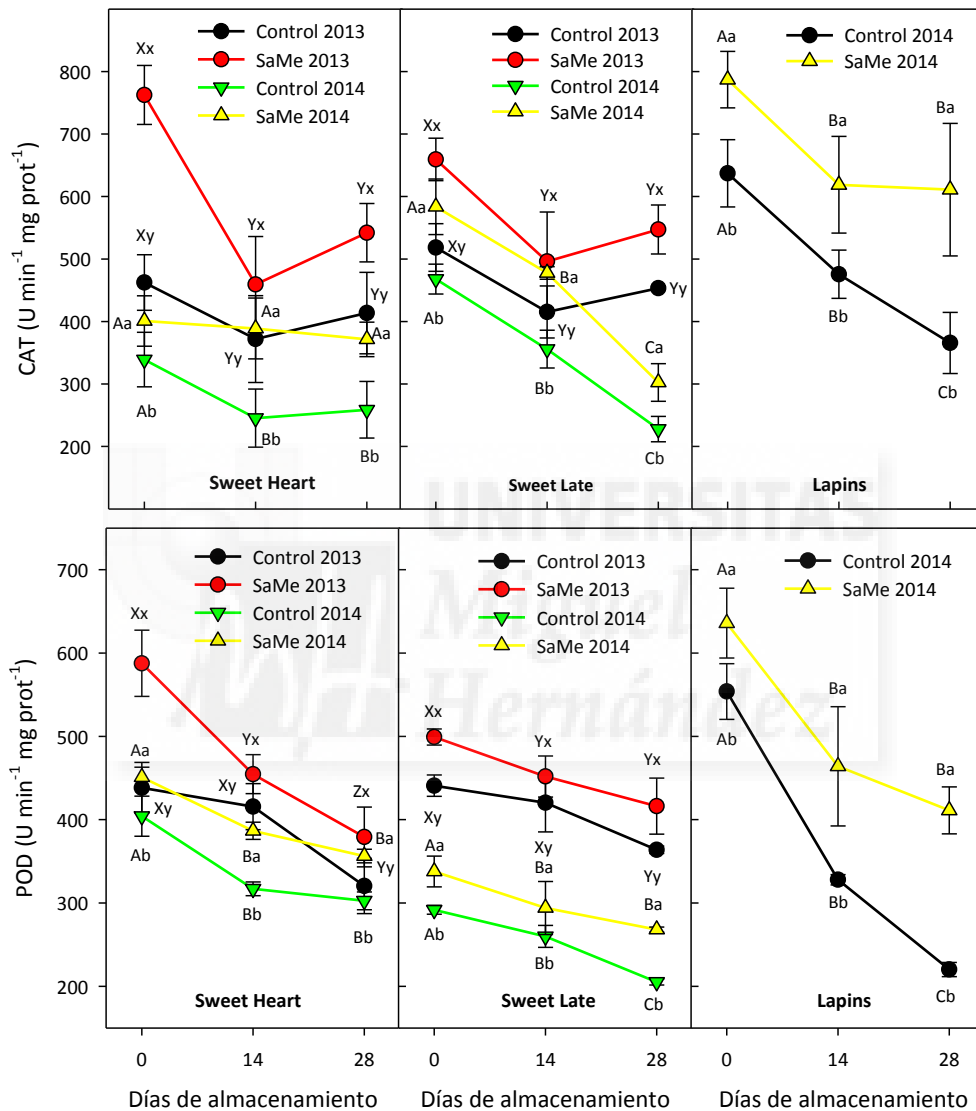


**Fig. 3.** Correlación entre actividad antioxidante hidrosoluble (AAT-H) y concentración de antocianinas totales o fenoles totales (a), teniendo en cuenta todos los datos de todos los años y variedades, y correlaciones entre la actividad antioxidante liposoluble (AAT-L) y la concentración de carotenoides (b), teniendo en cuenta los datos de cerezas control y tratadas para cada variedad y periodo de crecimiento.

### 3.2. Enzimas antioxidantes

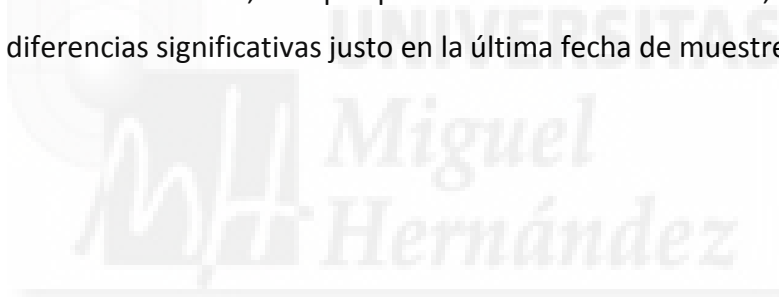
Las enzimas SOD, CAT, POD y APX están implicadas en respuestas de senescencia y estrés en tejidos vegetales, dado que es esencial una actividad eficiente de estas enzimas antioxidantes para evitar daños causados por ROS (Hodges et al., 2004; Kumar et al., 2014). Los resultados encontrados en este trabajo muestran una tendencia general en estas enzimas antioxidantes, es decir, disminuyeron durante el almacenamiento, aunque existían diferencias importantes entre las cerezas control y las tratadas, así como entre variedades y ciclos de crecimiento. La actividad CAT en la recolección fue significativamente mayor en cerezas tratadas con SaMe que en las control en las tres variedades estudiadas, y los datos para 2013 fueron mayores que los de 2014 en las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' (Fig. 4). La actividad CAT disminuyó durante el almacenamiento, especialmente desde el día 0 al 14, aunque la actividad CAT fue significativamente mayor en frutos tratados con SaMe que en frutos control, para todas las variedades y ciclos de crecimiento. Se observó un comportamiento similar para la actividad POD, es decir, POD disminuyó durante el

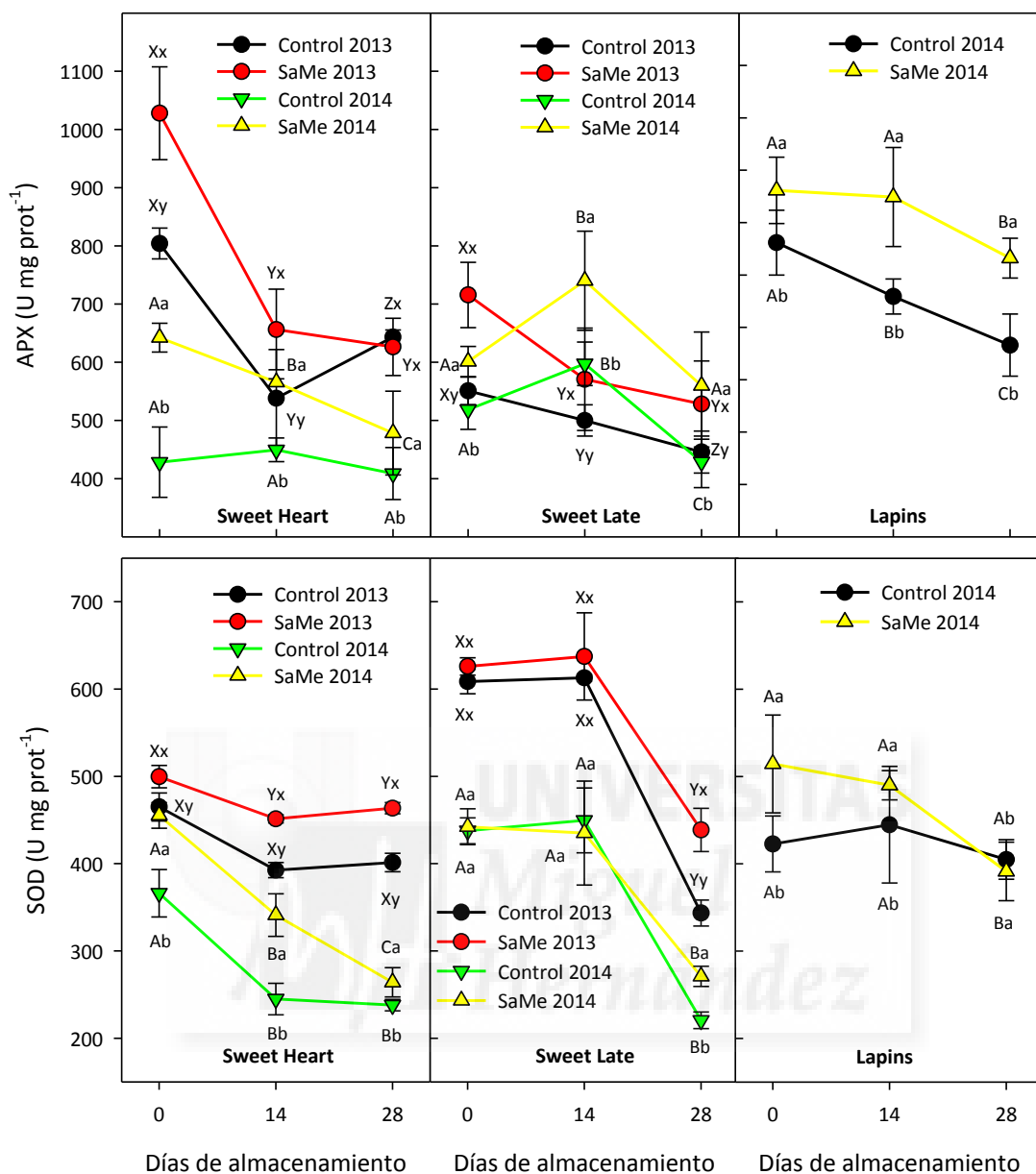
almacenamiento y la actividad fue significativamente mayor en frutos tratados con SaMe que en los controles (Fig. 4). Para estas enzimas antioxidantes, se encontró la mayor actividad en la variedad 'Lapins' en el momento de la recolección, y comparando ambos años, los valores fueron mayores en 2013 que en 2014 para las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late'.



**Fig. 4.** Actividad de las enzimas catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) en cerezas control y tratadas con salicilato de metilo (SaMe) de las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' para los años de experimento 2013 y 2014, y de la variedad 'Lapins' para el experimento de 2014, durante el almacenamiento a 2 °C + 1 día a 20 °C. Los datos son la media  $\pm$  ES. Las letras minúsculas distintas muestran diferencias significativas entre los frutos control y tratados para cada fecha de muestreo en 2013 (x, y) y en 2014 (a, b), mientras que las letras mayúsculas muestran diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento en 2013 (X, Y), y en 2014 (A, B, C).

La actividad APX en la recolección también fue mayor en los frutos tratados que en los control, aunque su evolución durante el almacenamiento fue dependiente del año y variedad. Así, en la variedad 'Sweet Heart' se observaron disminuciones en la actividad APX durante el almacenamiento en las muestras de 2013 y en los frutos tratados de 2014, mientras que no se produjeron cambios significativos en los frutos control de 2014. La actividad APX también disminuyó durante el almacenamiento en los frutos control y tratados de 'Sweet Late' en los experimentos de 2013, además de en la variedad 'Lapins', mientras que en las cerezas control y tratadas de 'Sweet Late' en los experimentos de 2014 esta enzima antioxidante aumentó desde la cosecha hasta el día 14 de almacenamiento y después disminuyó (Fig. 5). Sin embargo, la actividad APX fue siempre mayor en los frutos tratados que en los control. Finalmente, también se observó una disminución general durante el almacenamiento en la actividad SOD, siendo los valores significativamente mayores en frutos tratados con SaMe que en los frutos control, excepto para la variedad 'Sweet Late', para la cual se encontraron diferencias significativas justo en la última fecha de muestreo (Figura 5).





**Fig. 5.** Actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) en cerezas control y tratadas con salicilato de metilo (SaMe) de las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' para los años de experimento 2013 y 2014, y de la variedad 'Lapins' para el experimento de 2014, durante el almacenamiento a 2 °C + 1 día a 20 °C. Los datos son la media  $\pm$  ES. Las letras minúsculas distintas muestran diferencias significativas entre los frutos control y tratados para cada fecha de muestreo en 2013 (x, y) y en 2014 (a, b), mientras que las letras mayúsculas muestran diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento en 2013 (X, Y), y en 2014 (A, B, C).

Estudios previos han puesto de manifiesto que diversos tratamientos post-recolección presentaban efectos significativos sobre el retraso de los procesos de maduración y senescencia post-cosecha y mantuvieron mayor actividad de estas enzimas antioxidantes. Así, en cerezas la actividad de las enzimas CAT y POD fue mayor en frutos recubiertos con quitosano que en los controles (Dang et al., 2010). De acuerdo con los presentes resultados, He et al. (2013) observaron disminuciones en las actividades de CAT y POD durante el almacenamiento de cerezas, aunque los tratamientos de pre-enfriamiento mediante vacío antes del almacenamiento dieron lugar a una mayor actividad de estas enzimas en las cerezas tratadas que en las controles y retrasó el proceso de maduración post-cosecha. Del mismo modo, tratamientos post-cosecha de cerezas con hexanal o 1-metilciclopropeno dieron lugar a incrementos en la actividad SOD y a menores disminuciones en la actividad APX durante el almacenamiento si lo comparaban con cerezas control (Sharma et al., 2010). Igualmente, tratamientos post-cosecha con AS en melocotón aumentaron la actividad de las enzimas SOD, CAT y POD, aunque en este fruto estas enzimas antioxidantes aumentaron durante el almacenamiento a 0 °C (Tareen et al., 2012). Además, tratamientos post-cosecha de mango y *Annona squamosa* L. con AS mantuvieron mayores niveles de la actividad SOD, CAT y APX durante el almacenamiento, acompañados por un menor contenido de anión superóxido y menor actividad lipoxigenasa, en comparación con los valores encontrados en los frutos control (Ding et al., 2007; Mo et al., 2008). La acumulación de radicales superóxido durante el almacenamiento también se redujo en albaricoques tratados con AS 1 y 2 mM, debido a un incremento en la actividad SOD (Wang et al., 2015). Esto es de gran importancia, ya que la acumulación de  $O_2^{\bullet -}$  puede activar la formación de ROS reactivos simples como  $OH^{\bullet}$  o  $^1O_2$ , dando lugar a la peroxidación de lípidos de membrana y proteínas y a la aceleración del proceso de senescencia (Hodges et al., 2004; Mondal et al., 2009). Así, el aumento de estas enzimas antioxidantes, junto con el incremento de las concentraciones de compuestos antioxidantes, encontrados en cerezas (en la recolección y durante el almacenamiento), como consecuencia de tratamientos con SaMe, podría contribuir a eliminar los ROS generados durante el proceso de maduración y a su vez, a retrasar los procesos de maduración y senescencia post-cosecha. Estos efectos podrían explicar el mantenimiento de los atributos de calidad

del fruto durante el almacenamiento prolongado encontrado en cerezas de árboles tratados con SaMe (Giménez et al., datos no publicados) así como en granadas (Sayari et al., 2011a), naranja (Ahmad et al., 2013), mango (Ding et al., 2007), *Annona squamosa* L. (Mo et al., 2009), uva de mesa (Khalil, 2014) o melocotón (Wang et al., 2006) tras realizar tratamientos post-cosecha con AS o AAS.

#### **4. CONCLUSIONES**

En conclusión, todos los resultados muestran que los tratamientos pre-cosecha de cerezos con SaMe dieron lugar a frutos con incrementos en el contenido de compuestos antioxidantes, tales como fenoles y antocianinas totales, en el momento de la recolección y durante el almacenamiento, dando lugar a un incremento en la calidad nutricional y a una mejora en las propiedades beneficiosas para la salud del consumo de cerezas. Además, el aumento en enzimas antioxidantes inducidas por los tratamientos con SaMe puede resultar en un mayor potencial de eliminación de ROS, y a su vez en un retraso del proceso de senescencia, dando lugar a la preservación de atributos de calidad del fruto.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y la Comisión Europea con fondos FEDER a través del Proyecto AGL2012-35402/ALI. Agradecemos la valiosa ayuda a “Fincas Toli S.L.” por la provisión de cerezas y el asesoramiento técnico recibido durante los experimentos de 2013 y 2014, así como a “Cerezas Aitana” durante los experimentos de 2014.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahmad, S., Singh, Z Iqbal, Z. 2013. Effect of preharvest sprays of salicylic acid on the shelf life and quality of 'Lane Late' sweet orange (*Citrus sinensis* L.) cold storage. *Acta Hort.* 1012, 103-112.
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Ballistreri, G., Continella, A. Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., Rapisarda, P. 2013. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem.* 140, 630-638.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann. Biochem.* 72, 248-254.
- Chan, Z., Wang, Q., Xu, X., Meng, X., Qin, G., Li, B., Tian, S. 2008. Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics* 8, 4791-4807.
- Chen, J.-Y., Wen, P.-F., Kong, W.-F., Pan, Q.-H., Zhan, J.-C., Li, J.-M., Wan, S.-B., Huang, W.-D. 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biol. Technol.* 40, 64-72.
- Dang, Q. F., Yan, J. Q., Li, Y., Cheng, X. J., Liu, C. S., Chen, X. G. 2010. Chitosan acetate as an active coating material and its effects on the Storing of *Prunus avium* L. *J. Food Sci.* 75, S125-S131.
- Díaz-Mula, H. M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P. J., Guillén, F., Serrano, M. 2009. Organoleptic, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Sci. Technol. Int.* 15, 535-543.
- Díaz-Mula, H. M., Serrano, M., Valero, D. 2012. Alginate coatings preserve fruit quality and bioactive compounds during storage of sweet cherry fruit. *Food Bioproc. Technol.* 5, 2990-2997.
- Ding, Z. S., Tian, S. P., Zheng, X. L., Zhou, Z. W., Xu, Y. 2007. Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Phyiol. Plant.* 130, 112-121.



- Dokhanieh, A. Y., Aghdam, M. S., Fard, J. R., Hassanpour, H. 2013. Postharvest salicylic acid treatment enhances antioxidant potential of cornelian cherry fruit. *Sci. Horticult.* 154, 31-36.
- Fung, R. W. M., Wang, C. Y., Smith, D. L., Gross, K. C., Tian, M. 2004. MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 166, 711-719.
- Fung, R. W. M., Wang, C. Y., Smith, D. L., Gross, K. C., Tao, Y., Tian, M. 2006. Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 163, 1049-1060.
- Giménez, M. J., Valverde, J. M., Valero, D., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Castillo, S. 2014. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chem.* 160, 226-232.
- Gonçalves, B., Landbo, A. K., Knudse, D., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Rosa, E., Meyer, A. S. 2004. Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52, 523-530.
- Han, J., Tian, S. P., Meng, X. H., Ding, Z. H. 2006. Response of physiologic metabolism and cell structures in mango fruits to exogenous methyl salicylate under low temperature stress. *Physiol. Plant.* 128, 125-133.
- Hayat, S., Ahmad, A. 2007. *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Dordrecht: Springer.
- He, S. Y., Zhang, G. C., Yu, Y. Q., Li, R. G., Yang, Q. R. 2013. Effects of vacuum cooling on the enzymatic antioxidant system of cherry and inhibition of surface-borne pathogens. *Int. J. Refrig.* 36, 2387-2394.
- Hodges, D. M., Lester, G. E., Munro, K. D., Toivonen, P. M. A. 2004. Oxidative stress: importance for postharvest quality. *HortSci.* 39, 924-929.
- Khalil, H. A. 2014. Effects of pre- and postharvest salicylic acid application on quality and shelf life of 'Flame Seedless' grapes. *Eur. J. Hortic. Sci.*, 79: S8-15.
- Kumar, D. 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.* 228, 127-134.
- Kumar, S., Yadav, P., Jain, V. Malhotra, S. P. 2014. Isozymes of antioxidative enzymes during ripening and storage of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk.). *J. Food Sci. Technol.* 51, 329-334.

- McCune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollins, N. R., Thomson, C. A. 2011. Cherries and health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* 51, 1-12.
- Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R. Xie, J., Li, W. 2008. Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 88, 2693-2699.
- Mondal, K., Malhotra, S. P., Jain, V., Singh, R. 2009. Oxidative stress and antioxidant systems in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 15, 327-334.
- Norberto, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., Calhau, C. 2013. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *J. Funct. Foods* 5, 1518-1528.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D. 2011a. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chem.*, 124, 964-970.
- Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz-Mula, H. M., Serrano, M. 2011b. Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biol. Technol.* 60, 136-142.
- Serradilla, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., López-Corrales, M., Córdoba, M. D. G. 2012. Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain). *Food Chem.* 133, 1551-1559.
- Serrano, M., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J. M., Valero, D. 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3240-3246.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D. 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2741-2745.
- Sharma, M., Jacob, J. K., Subramanian, J., Paliyath, G. 2010. Hexanal and 1-MCP treatments for enhancing the shelf life and quality of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Sci. Horticult.* 125, 239-247.

- SPSS, Version 22.0 for Windows; SPSS Inc.: Chicago, IL, 2011.
- Tareen, M. J., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A. 2012. Postharvest application of salicylic acid enhanced antioxidant enzyme activity and maintained quality of peach cv. 'Flordaking' fruit during storage. *Sci. Horticult.* 142, 221-228
- Usenik, V., Fabčič, J., Štampar F. 2008. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* 107: 185-192.
- Valero, D., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M. 2011. Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *J. Agric. Food Chem* 59, 5483-5489.
- Valero, D., Mirdehghan, S. H., Sayyari, M., Serrano, M. 2015. Vapor Treatments, Chilling, Storage, and Antioxidants in Pomegranates. In V. R. Preedy, (Ed.), *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 189-196). London: Academic Press.
- Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S. Archbold, D.D. 2006. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 244-251.
- Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J., Jiang, W. 2015. The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Sci. Horticult.* 181: 113-120.
- Yao, H., Tian, S. 2005. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 35: 253-262.
- Zapata, P. J., Martínez-Esplá, A., Guillén, F., Díaz-Mula, H. M., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D. 2014. Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.* 98, 115-122.
- Zhang, Z., Huber, D.J., Rao, J., 2013. Antioxidant systems of ripening avocado (*Persea americana* Mill.) fruit following treatment at the preclimacteric stage with aqueous 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 76, 58-64.



---

# PUBLICACIÓN 3

---

## EFFECTO DE TRATAMIENTOS PRE-COSECHA CON ÁCIDO SALICILICO Y ÁCIDO ACETIL SALICILICO SOBRE LA CALIDAD Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES EN CEREZAS

---

María José Giménez <sup>a</sup>, Juan Miguel Valverde <sup>a</sup>, Daniel Valero <sup>a,\*</sup>, Fabián Guillén <sup>a</sup>, Domingo Martínez-Romero <sup>a</sup>, María Serrano <sup>b</sup>, Salvador Castillo <sup>a</sup>

a Departamento de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

b Departamento de Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

---

***Food Chemistry 160: 226-232 (2014)***

## Efecto de tratamientos pre-cosecha con ácido salicílico y ácido acetil salicílico sobre la calidad y propiedades antioxidantes en cerezas

María José Giménez <sup>a</sup>, Juan Miguel Valverde <sup>a</sup>, Daniel Valero <sup>a,\*</sup>, Fabián Guillén <sup>a</sup>, Domingo Martínez-Romero <sup>a</sup>, María Serrano <sup>b</sup>, Salvador Castillo <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

<sup>b</sup> Departamento de Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de tratamientos con compuestos naturales aplicados en pre-cosecha, ácido salicílico (AS) y ácido acetilsalicílico (AAS), sobre los atributos de calidad del fruto en el momento de la recolección y tras la conservación post-recolección, especialmente aquellos relacionados con el contenido en compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Para ello, se trabajó con dos variedades diferentes de cereza, 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' durante el ciclo de desarrollo comprendido en el periodo primavera-verano 2013. Los cerezos fueron tratados con AS y AAS a tres concentraciones diferentes: 0,5, 1 y 2 mM, y se aplicaron en tres puntos clave del desarrollo del fruto (lignificación del hueso, cambios iniciales de color e inicio de la maduración). Estos tratamientos dieron como resultado un incremento del tamaño y peso del fruto así como una mejora en los atributos de calidad en la recolección comercial (tales como color y firmeza), y se obtuvieron cerezas con mayor concentración en fenoles totales y antocianinas totales, así como mayor actividad antioxidante, tanto en la fracción hidrosoluble como liposoluble. Por tanto, estos resultados indican que los tratamientos pre-cosecha con AS o AAS pueden ser herramientas prometedoras para mejorar los atributos de calidad de las cerezas y los efectos beneficiosos para la salud del consumidor, en la recolección y conservación.

© 2014 Elsevier Ltd. Todos los derechos reservados.

**Palabras clave:** *Prunus avium* L, calidad, antocianinas, fenoles, actividad antioxidante, carotenoides.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ácido salicílico (AS) es una sustancia endógena de las plantas que juega un papel importante durante el crecimiento y desarrollo de éstas, actuando como molécula señal relacionada con las respuestas de defensa y proporcionando protección frente al ataque de patógenos (Beckers y Spoel, 2006; Hayat y Ahmad, 2007; Volt, Klessing y Park, 2008). Los tratamientos post-cosecha con AS han sido efectivos reduciendo podredumbres en una amplia variedad de frutos. Por ejemplo, tratamientos post-cosecha en *Annona squamosa* L. disminuyeron la tasa de podredumbre (relacionado con mayores niveles de enzimas antioxidantes durante el almacenamiento) y la producción de etileno y retrasaron el proceso de maduración post-cosecha, dando lugar a una mejora en su almacenamiento (Mo et al., 2008). Por otra parte, el AS redujo la podredumbre causada por *Botrytis cinerea*, disminuyó la producción de etileno y retrasó el proceso de maduración en tomate (Wang, Li, Quin, Li y Tian, 2011), así como en kiwi (Fatemi, Mohammadi y Aminifard, 2013). Además, los tratamientos post-cosecha con AS redujeron los daños por frío en mango, relacionados con la reducción de la actividad de la enzima antioxidante lipoxigenasa y con el aumento de la actividad superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) (Ding, Tian, Zheng y Xu, 2007), en ciruela (Luo, Chen y Xie, 2011), melocotón (Cao, Hu, Zheng y Lu, 2010) y granada (Sayyari, Babalar, Kalantari, Serrano y Valero, 2009; Sayyari, Castillo, Valero, Díaz-Mula y Serrano, 2011) entre otros. Por otro lado, el ácido acetilsalicílico (AAS) es un análogo cercano al AS y cuando se aplica exógenamente se convierte en AS espontáneamente, teniendo un efecto similar a AS interviniendo en los mecanismos de defensa de las plantas (Hayat y Ahmad, 2007). Además, tratamientos post-cosecha con AAS tuvieron efectos similares que el AS en la reducción de daños por frío en granadas (Sayyari et al., 2011) así como en la inhibición de la maduración y producción de etileno en kiwi (Yien et al., 2013).

Sin embargo, las investigaciones sobre el efecto de los tratamientos con AS en pre-cosecha son escasas y la mayoría de ellas están relacionadas con el efecto del AS sobre la inducción de la respuesta de defensa frente al ataque fúngico. Además, no hay información disponible sobre los efectos de los tratamientos con AAS en pre-cosecha sobre la calidad del fruto. De este modo, la aplicación de AS mediante pulverización

foliar o añadido a la solución de irrigación en las plantas de fresa, en combinación con tratamientos post-cosecha, redujo las podredumbres fúngicas de frutos y mejoró la calidad, en general, después de 14 días de almacenamiento (Babalar, Asghari, Talaei, y Khoroshahi, 2007). En jinjoleros, la aplicación pre-cosecha mediante pulverización foliar de AS 2 mM inhibió la podredumbre causada por *Alternaria alternata* y *Monillinia fructicola* en la recolección, y el efecto inhibitorio persistió durante el almacenamiento prolongado (Cao, Yan, Zhao y Jiang, 2013). En cerezas, Yao y Tian (2005) mostraron que tratamientos con AS 2mM en cerezas tres días antes de la recolección indujeron la resistencia del fruto frente a *M. fructicola* durante el almacenamiento, mediante el incremento de la actividad de las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasa, fenilalanina amonio liasa (PAL) y peroxidasa (POX). Del mismo modo, la resistencia de cerezas contra *Penicillium expansum* durante el almacenamiento post-cosecha fue incrementada por el tratamiento de los árboles con AS en el momento de la recolección, especialmente en frutos recolectados en estados tempranos de madurez (Chan et al., 2008).

Sin embargo, no existen estudios previos sobre los efectos de los tratamientos con AS o AAS durante el crecimiento y maduración de las cerezas en el árbol sobre los atributos de calidad del fruto, especialmente aquellos relacionados con el contenido en compuestos bioactivos y actividad antioxidante, siendo el principal objetivo de este estudio. Por tanto, se usaron dos variedades de cereza y se aplicaron los tratamientos AS y AAS a tres concentraciones diferentes y en tres puntos clave del desarrollo del fruto en el árbol.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y diseño experimental

En este experimento se usaron dos variedades de cereza 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' durante el ciclo de desarrollo comprendido en el periodo primavera-verano 2013. Estas cerezas fueron cultivadas en una finca comercial "Fincas Toli S.L" localizada en Jumilla (Murcia, España). Ambas variedades mostraron el mismo día de la plena floración (20 de Febrero) pero las fechas de recolección comercial fueron 8 de Julio (138 días después de la plena floración, DDPF) y 16 de Julio (145 DDPF) para



‘Sweet Heart’ y ‘Sweet Late’ respectivamente. Se seleccionaron tres árboles completamente al azar para cada variedad y tratamiento: control (agua destilada), ácido salicílico (AS) a tres concentraciones (0,5, 1 y 2 mM), y ácido acetil salicílico (AAS) a tres concentraciones (0,5, 1 y 2 mM). Se aplicaron soluciones recién preparadas (conteniendo un 0,5 % de Tween 20) mediante pulverización foliar con un pulverizador mecánico (7,5 L/árbol) y se repitió el proceso en 3 fechas del ciclo de crecimiento: T1 (lignificación del hueso, 98 DDPF), T2 (cambios de color iniciales, 112 DDPF) y T3 (inicio de la maduración, 126 DDPF). Estas fechas se correspondían con momentos clave en el proceso de desarrollo del fruto, de acuerdo con experimentos previos (Díaz-Mula et al., 2009). Una semana antes del tratamiento T1, se etiquetaron 20 frutos alrededor del perímetro ecuatorial, y en cada fruto se midió el diámetro polar, diámetro ecuatorial y diámetro de sutura para seguir su crecimiento y se calculó el volumen del fruto como se indica en estudios previos (Díaz-Mula et al., 2009). Semanalmente, desde una semana antes del tratamiento T1 hasta la recolección comercial, se recogieron 20 frutos (similares a aquellos etiquetados) para cada árbol (o réplica) para realizar posteriores determinaciones analíticas: firmeza del fruto, color, sólidos solubles totales (SST), acidez total (AT) y tasa de respiración. Además, se determinó el contenido en compuestos bioactivos (fenoles totales, antocianinas totales y carotenoides totales) y actividad antioxidante total, tanto en frutos control como en aquellos de los árboles tratados con AS 0,5 mM y AAS 1 mM, ya que con estas concentraciones se encontraron los mayores efectos sobre los parámetros de calidad del fruto. En el momento de la recolección, se seleccionaron al azar 100 frutos de cada árbol, variedad y tratamiento para determinar el peso del fruto y para su análisis sensorial.

## 2.2. Parámetros de calidad de las cerezas

El color se determinó en la superficie de cada cara de los 20 frutos para cada réplica, usando un colorímetro Minolta (CRC 200, Minolta Camera Co., Japón), usando las coordenadas CIELab y expresando los resultados como el índice  $a^*/b^*$ . La firmeza se determinó independientemente en 20 frutos de cada réplica usando un Texturómetro TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, UK) conectado con un

ordenador personal, con un plato plano de acero montado sobre el texturómetro. Para cada fruto, se midió su diámetro y se aplicó una fuerza hasta alcanzar una deformación del 3 % del diámetro del fruto. Los resultados se expresaron como la relación fuerza-deformación ( $\text{N mm}^{-1}$ ) y fueron la media  $\pm$  ES. Posteriormente, los 20 frutos de cada muestra fueron cortados en pequeñas piezas para obtener una muestra homogénea para cada réplica. Los sólidos solubles totales (SST) se midieron por duplicado en el zumo obtenido de 5 g de cada muestra con un refractómetro digital Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japón) a 20 °C, y se expresaron como  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  (media  $\pm$  ES). La acidez total (AT) se determinó por duplicado en el mismo zumo mediante titulación automática (785 DMP Titrino (Metrohm) con NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,1, usando 1 mL de zumo diluido en 25 mL de agua destilada, y los resultados (media  $\pm$  ES) fueron expresados como g de ácido málico equivalentes  $100 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco. Para la tasa de respiración, los 20 frutos de cada réplica se colocaron en un frasco de vidrio sellado herméticamente con un septum de goma durante 30 minutos. La tasa de producción de  $\text{CO}_2$  fue cuantificada usando un cromatógrafo de gases Shimadzu<sup>TM</sup> GC-14B con un detector de conductividad térmica (TCD). Los resultados fueron la media  $\pm$  ES y se expresaron como  $\text{mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### 2.3. Determinación de fenoles totales, antocianinas totales y actividad antioxidante

#### total

La extracción de fenoles se realizó usando agua: metanol (2:8) conteniendo FNA 2 mM (para inactivar la actividad de la polifenoloxidasa y prevenir la degradación fenólica) como se describió por Tomás-Barberán et al. (2001) y se cuantificaron usando el reactivo Folin-Ciocalteu. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalentes (GAE)  $100 \text{ g}^{-1}$  peso fresco.

Las antocianinas totales se determinaron según publicaciones previas (Serrano, Guillén, Martínez-Romero, Castillo y Valero, 2005) y se calcularon como cianidín 3-glucósido equivalentes (CGE, coeficiente de absorción molar de  $29.600 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  y peso molecular de  $449,2 \text{ g mol}^{-1}$ ) y los resultados se expresaron como  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  peso fresco, y fueron la media  $\pm$  ES.

Los carotenoides totales se extrajeron de acuerdo con Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993). Brevemente, se extrajeron los carotenoides de 2 g de cereza con acetona y se agitaron con éter dietílico y 10 % NaCl para la separación de las dos fases. La fase liposoluble se lavó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 %), y se saponificó con 10 % KOH en metanol, y los pigmentos se extrajeron posteriormente con éter dietílico, el cual se evaporó y después el residuo seco se diluyó y enrasó con acetona hasta 25 mL. Los carotenoides totales fueron estimados mediante la lectura de absorbancia a 450 nm de acuerdo con Valero et al. (2011) y expresados como mg de β-caroteno equivalentes (β-CE) 100 g<sup>-1</sup>, teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar ε= 2.560.

La actividad antioxidante total (AAT) se cuantificó de acuerdo con Serrano et al. (2009), que permite determinar en la misma extracción, la AAT debida tanto a los componentes hidrosolubles (AAT-H) como liposolubles (AAT-L). Brevemente, para cada muestra, 5 g de tejido se homogeneizaron en 5 mL de tampón fosfato 50 mM pH= 7,8 y 3 mL de acetato de etilo, y después se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fase superior fue usada para determinar la AAT-L y la fase inferior para la AAT-H. En ambos casos, la AAT se determinó usando el sistema enzimático compuesto por el cromóforo 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS), la enzima peroxidasa (HRP) y su substrato (peróxido de hidrógeno) que genera radicales ABTS<sup>•+</sup> de color verde-azulado que pueden medirse espectrofotométricamente a 730 nm. La disminución de absorbancia después de añadir el extracto de muestra fue proporcional a la AAT de la muestra. Se realizó una curva de calibrado con Trolox (ácido (R)-(+)-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-croman-2-carboxílico) (0-20 nmol) de Sigma (Madrid, España), y los resultados se expresaron como mg de Trolox equivalentes (TE) 100 g<sup>-1</sup>.

#### **2.4. Análisis sensorial**

Se seleccionaron diez panelistas, previamente entrenados con muestras comerciales de cerezas, para llevar a cabo una caracterización sensorial de los lotes estudiados. Para ello, 5 frutos, seleccionados al azar de 100 cerezas recolectadas en la última fecha de muestreo para cada árbol, variedad y tratamiento, se presentaron a cada panelista. El análisis descriptivo se realizó de acuerdo con métodos estándar internacionales (ISO 4121-2006) para evaluar la apariencia, color de la piel, sabor de la

cereza, dulzor, acidez y firmeza mediante el uso de una escala numerada de 1 (pobre) a 10 (excelente).

## 2.5. Análisis estadístico

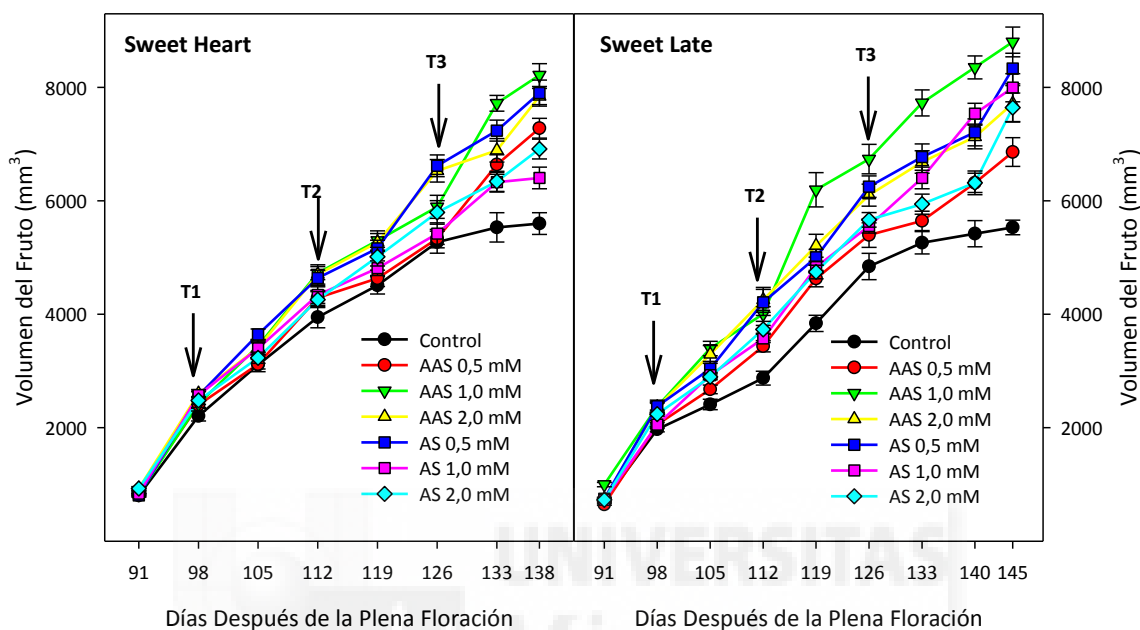
Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), siendo las fuentes de variación tiempo de almacenamiento y tratamiento. Se realizó una comparación de medias usando el test HSD de Tukey de comparación múltiple, para determinar si existían diferencias significativas para  $p < 0,05$ . Las regresiones lineales fueron realizadas entre AAT-H y antocianinas totales o entre AAT-L y carotenoides totales teniendo en cuenta los datos de las últimas fechas de muestreo y tratamientos para cada variedad y se calculó la correlación de regresión. Todos los análisis fueron realizados con el software SPSS v. 12.0 para Windows

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Parámetros de calidad de las cerezas

El crecimiento de las cerezas para ambas variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' siguió una curva doble sigmoide como ocurrió en estudios previos realizados con otras variedades (Díaz-Mula et al., 2009), alcanzando el fruto su tamaño final después de 133 y 140 días para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', respectivamente (Fig.1). Todos los tratamientos con ácido salicílico (AS) y ácido acetilsalicílico (AAS) en las tres concentraciones ensayadas (0,5, 1 y 2 mM) incrementaron el tamaño del fruto con respecto a los controles, siendo mayor el efecto en la variedad 'Sweet Late' que en 'Sweet Heart'. La concentración más efectiva de AAS fue 1 mM con la que se obtuvo un incremento de volumen del 47 y 59 % para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' respectivamente, en la fecha de recolección, mientras que la concentración más efectiva para AS fue 0,5 mM, con incrementos del 41 y 51 %. Se observó el mismo comportamiento cuando se determinó el peso del fruto basándose en el peso medio de 100 cerezas (Tabla 1). La aplicación en pre-cosecha de AAS a 1 mM incrementó el peso del fruto un 24 y 39 % para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', respectivamente. Por otro lado, 0,5 mM fue la concentración de AS más efectiva sobre el incremento de

peso del fruto, 13 y 37 % para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', respectivamente. Por consiguiente, como las cerezas de mayor tamaño son más apreciadas por los consumidores y alcanzan mayores precios en los mercados que las de menor tamaño, estos tratamientos podrían mejorar el rendimiento económico del cultivo.



**Fig.1.** Influencia de los tratamientos ácido salicílico (AS) y ácido acetil salicílico (AAS) a 0, 0,5, 1 y 2 mM sobre la evolución del volumen del fruto de cerezas 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', aplicados en tres puntos clave del desarrollo del fruto (T1, T2 y T3). Los datos son la media  $\pm$  ES de 60 frutos.

El color del fruto en las cerezas es uno de los atributos más importantes relacionado con la calidad del fruto, junto con sólidos solubles totales (SST), acidez total (AT) y firmeza. Estudios previos demuestran que el cociente  $a^*/b^*$  es un índice adecuado para seguir el proceso de maduración en el árbol, ya que se han encontrado rápidos incrementos con la maduración y diferencias importantes entre variedades. También se encontraron incrementos en SST y AT durante la maduración en el árbol de una amplia gama de variedades de cereza, mientras que se producían disminuciones de la firmeza del fruto (Serrano et al., 2005, 2009; Díaz-Mula et al., 2009). Asimismo en este trabajo, en las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', los parámetros de índice de color  $a^*/b^*$ , SST y AT incrementaron, mientras que la firmeza disminuyó, tanto en los frutos control como en los tratados con AS o AAS, y por tanto, sólo se muestran los

datos del último muestreo para estos parámetros de calidad (Fig. 2 y Tabla 1). La aplicación de ambos tratamientos (AS y AAS) afectó el color externo de las variedades de cereza ya que se observaron significativamente mayores índices a\*/b\* en las cerezas tratadas que en las control en la fecha de la recolección, especialmente para los tratamientos AAS 1 mM y AS 0,5 mM (Fig. 2).

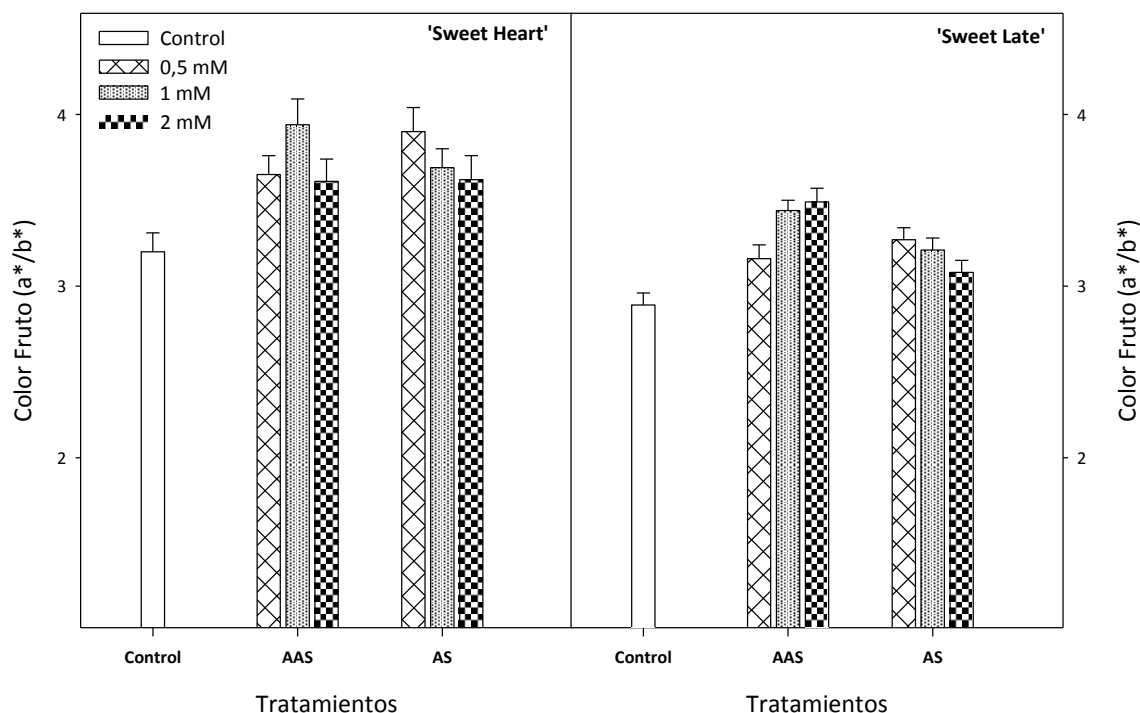
**Tabla 1:** Efecto de los tratamientos\* ácido salicílico (AS) y ácido acetil salicílico (AAS) sobre los parámetros de calidad del fruto: peso<sup>1</sup> (g), firmeza<sup>1</sup> (N mm<sup>-1</sup>), sólidos solubles totales<sup>2</sup> (SST, g 100 g<sup>-1</sup>), acidez total<sup>2</sup> (AT, g 100 g<sup>-1</sup>) y tasa de respiración<sup>2</sup> (mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) en la recolección en las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late'.

	Peso	Firmeza	SST	AT	Tasa de respiración
<b>'Sweet Heart'</b>					
Control	6,77 ± 0,13 a	2,95 ± 0,15 a	19,82 ± 0,11 a	1,48 ± 0,10 a	20,62 ± 1,63 a
AS (0,5 mM)	7,64 ± 0,14 b	3,87 ± 0,08 b	20,83 ± 0,06 b	1,50 ± 0,08 a	22,14 ± 1,40 a
AS (1,0 mM)	7,13 ± 0,15 c	3,43 ± 0,13 c	20,00 ± 0,32 a	1,45 ± 0,09 a	20,27 ± 0,54 a
AS (2,0 mM)	7,38 ± 0,13 bc	3,52 ± 0,10 c	18,85 ± 0,23 c	1,56 ± 0,08 a	22,77 ± 1,17 a
AAS (0,5 mM)	7,52 ± 0,06 b	3,37 ± 0,09 c	19,50 ± 0,55 a	1,49 ± 0,12 a	19,48 ± 2,13 a
AAS (1,0 mM)	8,34 ± 0,09 d	3,39 ± 0,09 c	20,13 ± 0,12 a	1,58 ± 0,07 a	20,73 ± 1,02 a
AAS (2,0 mM)	7,83 ± 0,22 b	2,73 ± 0,10 a	19,30 ± 0,21 a	1,60 ± 0,09 a	18,06 ± 1,33 a
<b>'Sweet Late'</b>					
Control	6,62 ± 0,24 a	3,01 ± 0,05 a	20,01 ± 0,20 a	1,39 ± 0,09 a	9,66 ± 0,64 a
AS (0,5 mM)	9,08 ± 0,21 b	3,63 ± 0,14 b	19,65 ± 0,16 a	1,45 ± 0,11 a	10,21 ± 0,56 a
AS (1,0 mM)	8,71 ± 0,14 b	3,43 ± 0,07 b	19,45 ± 0,38 a	1,46 ± 0,09 a	10,97 ± 0,43 a
AS (2,0 mM)	8,55 ± 0,08 c	3,21 ± 0,11 a	17,33 ± 0,47 b	1,49 ± 0,08 a	9,24 ± 0,13 a
AAS (0,5 mM)	7,30 ± 0,08 c	3,46 ± 0,08 b	19,53 ± 0,62 a	1,46 ± 0,09 a	10,63 ± 0,98 a
AAS (1,0 mM)	9,19 ± 0,18 b	3,81 ± 0,18 c	21,63 ± 0,22 c	1,44 ± 0,08 a	9,46 ± 0,48 a
AAS (2,0 mM)	8,83 ± 0,23 b	3,64 ± 0,11 b	18,28 ± 0,16 d	1,44 ± 0,07 a	9,74 ± 1,88 a

\* Para cada parámetro y variedad las distintas letras muestran diferencias significativas a p < 0,05.

<sup>1</sup>Los datos son la media ± ES de las determinaciones realizadas en 60 frutos.

<sup>2</sup>Los datos son la media ± ES de las determinaciones realizadas por duplicado en 3 muestras de 20 frutos.



**Fig.2.** Color del fruto en la recolección comercial de las variedades de cereza 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' tratadas con ácido salicílico (AS) y ácido acetil salicílico (AAS) a tres concentraciones: 0,5, 1 y 2 mM. Los datos son la media  $\pm$  ES de 60 frutos.

La firmeza del fruto en la recolección fue generalmente mayor en los frutos tratados que en los control en ambas variedades. Los frutos con la mayor firmeza fueron aquellos tratados con AAS a 1 mM para la variedad 'Sweet Late' y aquellos tratados con AS a 0,5 mM para 'Sweet Heart'. Con respecto a SST, los efectos observados dependieron del tratamiento y variedad (oscilando entre 17 y 21 g 100 g<sup>-1</sup>), aunque la aplicación de la mayor concentración (2 mM) para ambos AAS y AS en 'Sweet Late' y para AS en 'Sweet Heart' dio lugar a los menores niveles de SST en la fecha de recolección. De este modo, en árboles tratados con AS o AAS 2 mM, en general, podría ocurrir un retraso en el proceso de maduración del fruto, ya que el contenido de azúcares incrementó con la maduración de la cereza en el árbol (Díaz-Mula et al., 2009; Serradilla et al., 2012). Sin embargo, los valores de SST de cerezas control y tratadas de ambas variedades estuvieron por encima del límite de 14-16 g 100 g<sup>-1</sup> sugerido por Crisosto, Crisosto y Methenery (2003) como aceptable para su comercialización en una amplia gama de variedad de cerezas. Sin embargo, no se

observaron diferencias significativas en los valores finales de AT debido a los tratamientos de AS o AAS independientemente de la variedad y concentración. Del mismo modo, no se encontraron efectos significativos sobre AT ni SST en piña cuando se trató en pre-cosecha con AS 2 mM aplicado cuatro veces a intervalos de 15 días antes de la recolección (Lu, Sun, Li, Shi y Sun 2011). Finalmente, no se observó ninguna diferencia entre las cerezas control y tratadas sobre la tasa de respiración, aunque la tasa de producción de CO<sub>2</sub> fue dos veces mayor en 'Sweet Heart' (18-22 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) que en 'Sweet Late' (9-11 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Sin embargo, tratamientos de ciruelas en post-cosecha con AS disminuyeron y retrasaron el inicio de la tasa de respiración climatérica (Luo et al., 2011), así como en *Annona squamosa* L. (Mo et al., 2008), lo cual es crucial para prolongar el tiempo de almacenamiento de los frutos.

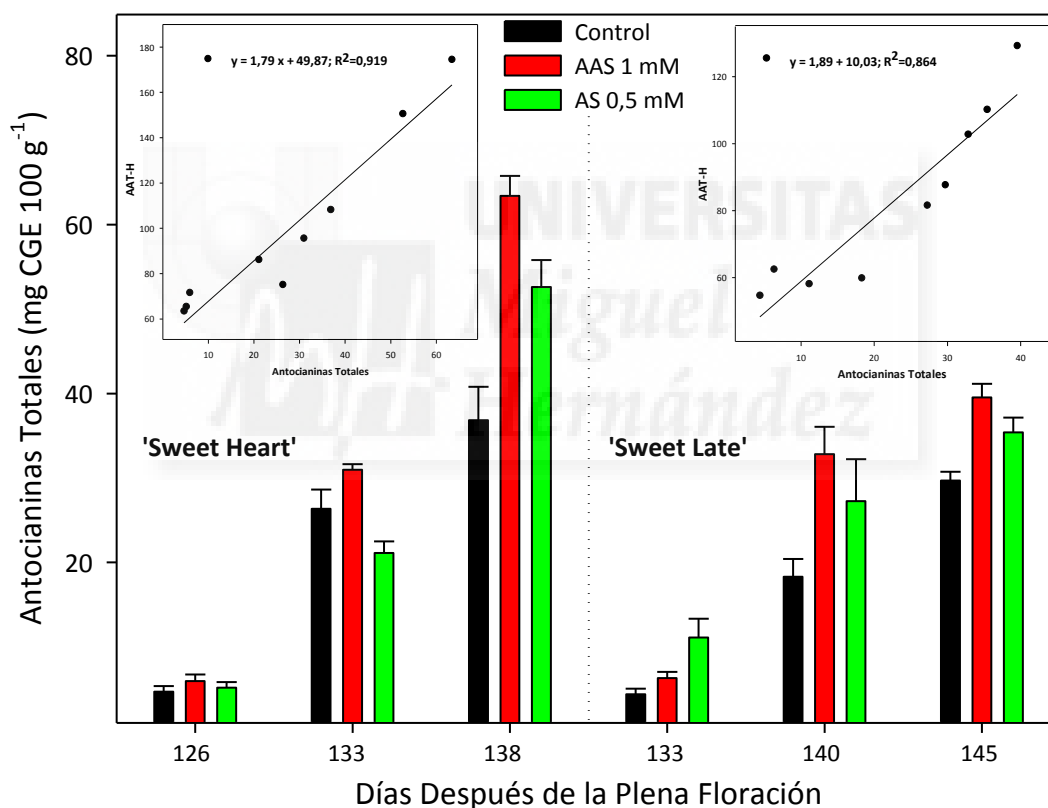
Los análisis sensoriales revelaron que no había diferencias significativas entre los frutos control y los tratados con AS o AAS para ambas variedades de cerezas sobre la apariencia, color, dulzor y acidez (datos no mostrados), mostrando que estos tratamientos no aportaban efectos negativos sobre el sabor o flavor del fruto. Para todos los parámetros, variedades y tratamientos las calificaciones obtenidas tuvieron valores entre 8 y 9, lo que indica que los atributos se valoraron como muy buenos y excelentes.

### **3.2. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante total**

De acuerdo con los resultados anteriores, los compuestos bioactivos y actividad antioxidante total fueron determinados en muestras tratadas con AAS 1 mM y AS 0,5 mM ya que la aplicación de estas concentraciones fue la que mayores efectos tuvo sobre el tamaño, peso, firmeza y SST del fruto. Los compuestos antioxidantes en alimentos procedentes de plantas están clasificados como hidrosolubles (compuestos fenólicos, incluyendo antocianinas, ácido ascórbico, resveratrol y glutatión) y liposolubles (carotenoides, tocoferoles y tocotrioles), teniendo ambos grupos efectos beneficiosos sobre la salud humana (Martín, Zhan, Tonelli y Petroni, 2013; Valero y Serrano, 2010).



Las antocianinas totales fueron determinadas en las tres últimas fechas de muestreo para ambas variedades, ya que la pulpa estaba aún clara y la concentración de antocianinas era muy baja en fechas previas. Como se esperaba, las antocianinas totales incrementaron durante la maduración en el árbol alcanzando concentraciones finales de 40 y 30 mg 100 g<sup>-1</sup> para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', respectivamente en muestras control, mostrando un contenido medio de antocianinas si las comparamos con otras variedades de cerezas (Ballistreri et al., 2013; Díaz-Mula et al., 2009; Serra, Duarte, Bronze y Duarte, 2011). Cabe destacar que, las aplicaciones pre-cosecha de ambos compuestos incrementó el contenido de antocianinas totales en ambas variedades, siendo el tratamiento más efectivo AAS 1 mM (Fig. 3).

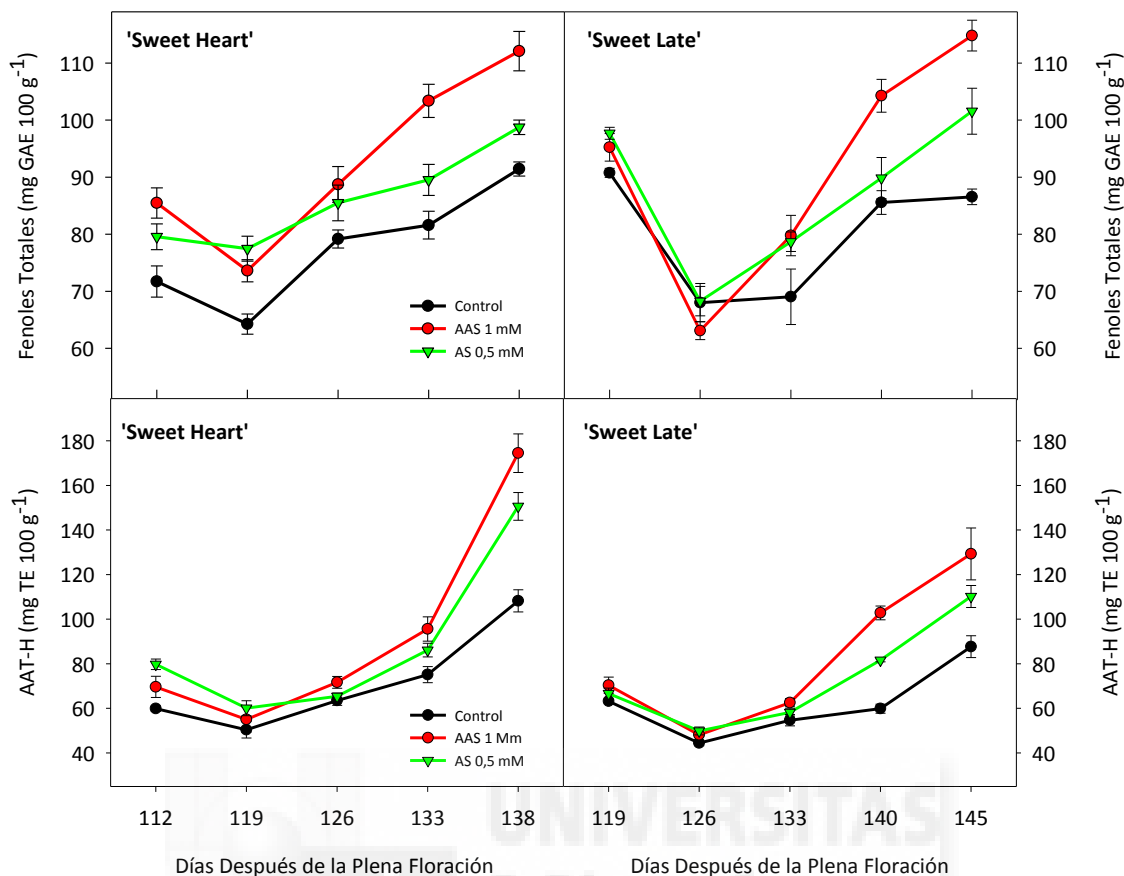


**Fig. 3.** Efecto de los tratamientos ácido salicílico 0,5 mM (AS) y ácido acetil salicílico (AAS) 1mM sobre la evolución de antocianinas totales durante las dos últimas semanas de desarrollo del fruto de las variedades de cereza 'Sweet Heart' y 'Sweet Late'. Las figuras insertadas representan la correlación lineal entre la actividad antioxidante total hidrosoluble (AAT-H) y antocianinas totales para cada variedad. Los datos son la media  $\pm$  ES de las determinaciones realizadas por duplicado en 3 muestras de 20 frutos.

La concentración de fenoles totales inicialmente disminuyó y después aumentó durante las tres últimas fechas de muestreo alcanzando concentraciones de 90 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> en las cerezas control para ambas variedades (Fig.4). Por tanto, el contenido total de fenoles en la recolección comercial en estas variedades podría ser considerado como medio, si lo comparamos con el rango de 50-160 mg 100 g<sup>-1</sup> citado para otras variedades (Ballistreri et al., 2013; Díaz-Mula et al., 2009; Serra et al., 2011; Serradilla et al., 2012). La aplicación de ambos tratamientos (AAS y AS) dio lugar a un incremento en el contenido de fenoles totales, el cual fue evidente en la segunda aplicación (T2), observándose el mayor efecto en los frutos tratados con AAS 1 mM (110 mg GAE 100g<sup>-1</sup>). Del mismo modo, la pulverización foliar de los árboles con AS indujo también un aumento del contenido fenólico en la recolección en naranjas Navel (Huang, Xia, Lu, Hu y Xu, 2008) y jínjoles (Cao et al., 2013). Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual los salicilatos aumentan los compuestos fenólicos aún no está claro. Una explicación podría ser atribuida al papel que juega el AS como molécula señal induciendo la biosíntesis de compuestos de defensa, tales como los compuestos fenólicos. Además, se ha demostrado que AS estimula la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) (Yao y Tian, 2005), la cual podría ser la responsable de la síntesis *de novo* de compuestos fenólicos. Además, AS y AAS aplicados como tratamientos post-cosecha dieron lugar a mayores niveles de compuestos bioactivos y actividad antioxidante si lo comparamos con los frutos control, en cerezas (Valero et al., 2011), granadas (Sayyari et al., 2011) y ciruelas (Davarynejad, Zarei, Nasrabadi y Ardakani, 2013), lo cual podría atribuirse a un incremento en la concentración endógena de AS y AAS en estos frutos.

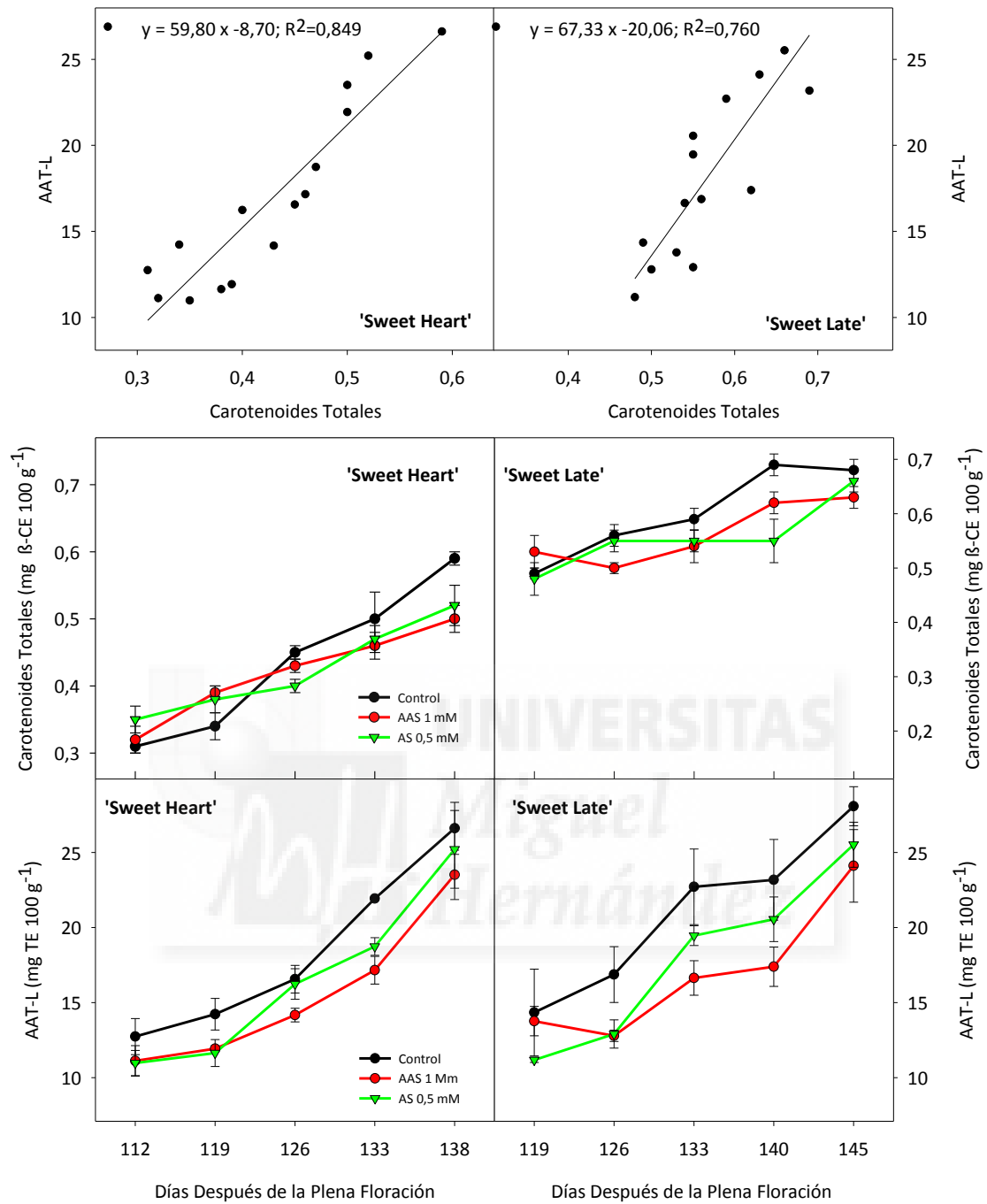
Se observó un efecto similar de los tratamientos de AAS y AS cuando se midió la actividad antioxidante total (AAT) en la fracción hidrosoluble (AAT-H). Es decir, la AAT-H aumentó en ambas variedades de cereza durante las dos últimas semanas de desarrollo del fruto, siendo estos incrementos mayores en frutos de árboles tratados con AAS y AS que en los frutos control. Sin embargo, para este parámetro el efecto de los tratamientos con AAS y AS fue mayor para la variedad 'Sweet Heart' que para 'Sweet Late' (Fig.4). En estudios previos se observó un efecto similar sobre el incremento de AAT-H cuando se aplicaron los tratamientos AS y AAS en post-cosecha, en cereza (Valero et al., 2011) y granada (Sayyari et al., 2011). En estudios previos, la

AAT-H ha sido correlacionada con el contenido en compuestos fenólicos en una amplia diversidad de variedades de cereza (Ballistreri et al., 2013; Díaz-Mula et al., 2009; Serrano et al., 2011; Usenik, Fabčič, y Štampar., 2008), de forma similar a lo encontrado en el presente estudio. De este modo, la AAT-H estuvo positivamente correlacionada con los fenoles totales en `Sweet Heart´ ( $y = 2,44x - 124$ ;  $R^2 = 0,744$ ) y en `Sweet Late´ ( $y = 1,44x - 52$ ;  $R^2 = 0,769$ ), mostrando que la mayoría de los compuestos hidrosolubles con actividad antioxidante son aquellos de naturaleza fenólica. Además, ya que el contenido de fenoles totales fue similar en ambas variedades, la mayor AAT-H encontrada en `Sweet Heart´ con respecto a `Sweet Late´ podría ser atribuida al mayor contenido en antocianinas totales de `Sweet Heart´. De hecho, las correlaciones entre AAT-H y antocianinas totales fueron mayores que aquellas entre AAT-H fenoles totales, con curvas de regresión para `Sweet Heart´ ( $y = 1,79x + 50$ ;  $R^2 = 0,919$ ) y para `Sweet Late´ ( $y = 1,89x + 40$ ;  $R^2 = 0,864$ ) (Fig. 3. insertas). Sin embargo, la actividad antioxidante puede también depender de la presencia de compuestos fenólicos específicos, tales como flava-3-oles, flavonoles y procianidinas (Kelebek y Selli, 2011). De hecho, en las variedades `Sweet Late´ y `Sweet Heart´ nuestro grupo ha encontrado que los principales flavonoles individuales fueron myricetin 3-rutinósido seguido por quercetin 3-rutinósido y kaempferol 3-rutinósido en ambas variedades de cereza, y los principales derivados del ácido clorogénico, fueron ácido neoclorogénico y ácido clorogénico, y todos ellos resultaron aumentados significativamente en los frutos tratados con ácido oxálico (AO) (datos no publicados). Además, se ha demostrado que los compuestos fenólicos y especialmente las antocianinas son los compuestos principales responsables de los efectos beneficiosos para la salud humana del consumo de cerezas, tales como la inhibición del crecimiento de células cancerígenas derivadas del colon y estómago (Serra et al., 2011).



**Fig. 4.** Efecto de los tratamientos ácido salicílico (AS) 0,5 mM y ácido acetil salicílico (AAS) 1 mM sobre la evolución del contenido en fenoles totales y actividad antioxidante total hidrosoluble (AAT-H) de cerezas 'Sweet Heart' y 'Sweet Late'. Los datos son la media  $\pm$  ES de las determinaciones realizadas por duplicado en 3 muestras de 20 frutos.

El contenido de carotenoides totales incrementó durante la maduración del fruto en el árbol alcanzando concentraciones finales en frutos control de 0,6-0,7 mg CE 100 g<sup>-1</sup> para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', respectivamente (Fig. 5). Una evolución similar se encontró en cerezas tratadas, aunque los niveles finales fueron significativamente reducidos sin diferencias significativas entre los tratamientos AAS y AS. Este patrón de carotenoides totales fue también seguido por la AAT-L, que mostró los mayores valores en frutos control si comparamos con frutos tratados, y por tanto, se encontró una elevada correlación entre AAT-L y carotenoides totales con curvas de correlación  $y = 59,80x - 8,70$ ;  $R^2 = 0,849$  e  $y = 97,33x - 20,06$ ;  $R^2 = 0,760$  para 'Sweet Heart' y 'Sweet Late' respectivamente. Por tanto, los carotenoides podrían ser el principal compuesto liposoluble con actividad antioxidante en cerezas.



**Fig. 5.** Efecto de los tratamientos con ácido salicílico (AS) 0,5 mM y ácido acetil salicílico (AAS) 1 mM sobre la evolución de carotenoides totales y actividad antioxidante liposoluble (AAT-L) de cerezas de las variedades 'Sweet Heart' y 'Sweet Late'. Las figuras superiores representan la correlación lineal entre la actividad antioxidante total liposoluble (AAT-L) y carotenoides totales para cada variedad.

#### 4. CONCLUSIONES

Todos los resultados mostraron que los tratamientos pre-cosecha con AS y AAS incrementaron algunos parámetros de calidad, tales como peso del fruto, firmeza, contenido en compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes de cerezas en la recolección comercial. Entre las concentraciones ensayadas (0,5, 1 y 2 mM), los mayores efectos fueron encontrados con AS a 0,5 mM y AAS a 1 mM en ambas variedades de cerezas. Por otro lado, no se observó ningún efecto perjudicial de estos tratamientos sobre SST, AT, sabor y flavor. Por tanto, AS y AAS son componentes naturales de las plantas que podrían ser considerados como herramientas prometedoras para mejorar atributos de calidad de los frutos y mejorar el potencial de beneficios saludables del consumo de cerezas.

#### AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del Proyecto AGL2012-35402/ALI y la Comisión Europea con fondos FEDER. Agradecemos a “Fincas Toli Frutas S.L.” por el permiso para usar sus explotaciones, la provisión de cerezas y el asesoramiento técnico recibido.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Babalar, M., Asghari, M., Talaei, A., & Khosroshahi, A. (2007). Effect of pre- and postharvest salicylic acid treatment on ethylene production, fungal decay and overall quality of Selva strawberry fruit. *Food Chemistry*, *105*, 449-453.
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., & Rapisarda, P. (2013). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chemistry*, *140*, 630-638.
- Beckers, G. J. M., & Spoel, S. H. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, *8*, 1-10.

- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., & Lu, B. (2010). Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *58*, 93-97.
- Cao, J.K., Yan, J.Q., Zhao, Y.M., & Jiang, W.B. (2013). Effects of four pre-harvest foliar sprays with  $\beta$ -aminobutyric acid or salicylic acid on the incidence of post-harvest disease and induced defence responses in jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) fruit after storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *88*, 338-344.
- Chan, Z., Wang, Q., Xu, X., Meng, X., Qin, G., Li, B., & Tian. (2008). Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics*, *8*, 4791-4807.
- Crisosto, C. H., Crisosto, G. M., & Metheney, P. (2003). Consumer acceptance of 'Brooks' and 'Bing' cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biology and Technology*, *28*, 159-167.
- Davarynejad, G. H., Zarei, M., Nasrabadi, M. E., & Ardakani, E. (2013). Effects of salicylic acid and putrescine on storability, quality attributes and antioxidant activity of plum cv. 'Santa Rosa'. *Journal of Food Science and Technology* (In press, DOI: 10.1007/s13197-013-1232-3).
- Díaz-Mula, H. M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P. J., Guillén, F., & Serrano, M. (2009). Organoleptic, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Science and Technology International*, *15*, 535-543.
- Ding, Z. S., Tian, S. P., Zheng, X. L., Zhou, Z. W., & Xu, Y. (2007). Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiologia Plantarum*, *130*, 112-121.
- Fatemi, H., Mohammadi, S., & Aminifard, M.H. (2013). Effect of postharvest salicylic acid treatment on fungal decay and some postharvest quality factors of kiwi fruit. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *46*, 1338-1345.
- Hayat, S., & Ahmad, A. (2007). *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Dordrecht: Springer.
- Huang, R., Xia, R., Lu, Y., Hu, L., & Xu, Y. (2008). Effect of pre-harvest salicylic acid spray treatment on post-harvest antioxidant in the pulp and peel of 'Cara cara' navel

- orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 229–236.
- ISO 4121-2006, (2006). [http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?codigo=N0037445&tipo=N&PDF=Si#.Uuo\\_4T15PLI](http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?codigo=N0037445&tipo=N&PDF=Si#.Uuo_4T15PLI). Accessed 12/18/2013.
- Kelebek, H., & Selli, S. (2011). Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2530-2537.
- Lu, X., Sun, D., Li, Y., Shi, W., & Sun, G. (2011). Pre- and post-harvest salicylic acid treatments alleviate internal browning and maintain quality of winter pineapple fruit. *Scientia Horticulturae*, 130, 97-101.
- Luo, Z., Chen, C., & Xie, J. (2011). Effect of salicylic acid treatment on alleviating postharvest chilling injury of 'Qingnai' plum fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 62, 115-120.
- Martin, C., Zhang, Y., Tonelli, C., & Petroni, K. (2013). Plants, diet, and health. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 19-46.
- Mínguez-Mosquera, M. I., & Hornero-Méndez, D. (1993). Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1616-1620.
- Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R., Xie, J., & Li, W. (2008). Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2693-2699.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Serrano, M., & Valero, D. (2009). Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 152-154.
- Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz-Mula, H.M., & Serrano, M. (2011). Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 136-142.
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R. & Duarte, C. M. M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125, 318-325.



- Serradilla, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., López-Corrales, M., & Córdoba, M. D. G. (2012). Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain). *Food Chemistry*, *133*, 1551-1559.
- Serrano, M., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J. M., & Valero, D. (2009). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 3240-3246.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., & Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 2741-2745.
- SPSS, VERSION 12.0 for Windows; SPSS Inc.: Chicago, IL, 2001.
- Tomás-Barberán F. A., Gil M. I., Cremin P., Waterhouse A. L., Hess-Pierce, B., & Kader A. A. (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4748-4760.
- Usenik, V., Fabčič, J., & Štampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, *107*, 185-192.
- Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., & Serrano, M. (2011). Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 5483-5489.
- Valero, D., & Serrano, M. (2010). *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*. Boca Raton: CRC-Taylor & Francis.
- Volt, A. C., Klessig, D. F., & Park, S. W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, *11*, 436-442.
- Wang, Y. Y., Li, B. Q., Qin, G. Z., Li, L., & Tian, S. P. (2011). Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. *Scientia Horticulturae*, *129*, 183-188.

Yao, H., & Tian, S. (2005). Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 253-262.

Yin, X. R., Zhang, Y., Zhang, B., Yang, S. L., Shi, Y. N., Ferguson, I. B., Chen, K. S. (2013). Effects of acetylsalicylic acid on kiwifruit ethylene biosynthesis and signaling components. *Postharvest Biology and Technology*, 83, 27-33.



## **Capítulo 5. Artículos Enviados**

---

*MH Miguel  
Hernández*



---

# ARTÍCULO 1

---

## TRATAMIENTOS PRE-COSECHA CON ÁCIDO SALICLICO Y ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO MANTIENEN LA CALIDAD Y AUMENTAN LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES DURANTE EL ALMACENAMIENTO POST-COSECHA DE CEREZAS

---

M<sup>º</sup> José Giménez<sup>1</sup>, María Serrano<sup>2</sup>, Juan Miguel Valverde<sup>1</sup>, Salvador Castillo<sup>1</sup>, Daniel Valero<sup>1</sup>, Fabián Guillén<sup>1,\*</sup>

1 Departamento de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

2 Departamento de Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España

---

***Food Chemistry***

*(FOODCHEM-S-15-05926)*

---

# ARTÍCULO 2

---

## **TRATAMIENTOS POST-COSECHA CON SALICILATO DE METILO RETRASAN EL PROCESO DE MADURACIÓN Y MANTIENEN LOS ATRIBUTOS DE CALIDAD Y LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN CEREZA `EARLY LORY`**

---

M<sup>º</sup> José Giménez<sup>1</sup>, Juan Miguel Valverde<sup>1</sup>, Daniel Valero<sup>1</sup>, Pedro J. Zapata<sup>1</sup>, Domingo Martínez-Romero<sup>1</sup>, María Serrano<sup>2\*</sup>

1 Departamento de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

2 Departamento de Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, España

---

**Postharvest Biology and Technology**

(POSTEC-S-15-01020)

## Capítulo 6. Discusión

---







## 6. DISCUSIÓN

Las cerezas (*Prunus avium* L.) son muy apreciadas por consumidores de todo el mundo, debido a sus atributos de calidad organoléptica, especialmente aquellos relacionados con el dulzor, acidez, firmeza y color rojo brillante, aunque estos parámetros de calidad varían dependiendo de la variedad, estado de madurez en la cosecha y condiciones de almacenamiento en post-cosecha. Además de estos parámetros, la cereza también es apreciada por su contenido en compuestos fitoquímicos con propiedades antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos, antocianinas y vitaminas (Gonçalves et al., 2007; Díaz-Mula et al., 2008; Usenik et al., 2008; Valero y Serrano, 2010). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el consumo de cerezas está relacionado con la reducción de diversas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, y otras enfermedades inflamatorias mediante la reducción del estrés oxidativo, la inflamación, la supresión tumoral y el control de la glucosa (McCune et al., 2011; Delgado et al., 2012). Entre los compuestos relacionados con la salud, el mayor interés se ha centrado en las antocianinas y otros polifenoles, carotenoides y vitaminas C y E. En cereza, el potencial antioxidante se ha asociado con el contenido de ácido ascórbico, compuestos fenólicos y antocianinas (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004; Serrano et al., 2005; 2009).

Las cerezas son frutos conocidos por aportar una excelente fuente de polifenoles en la dieta humana, aunque existen diferencias entre cultivares. En un rango amplio de variedades de cerezas se ha comprobado que el contenido de fenoles totales variaba entre 60 a 200 mg 100 g<sup>-1</sup> en el momento de recolección comercial (Díaz-Mula et al., 2009; Mozetič et al. 2002). Puesto que los compuestos fenólicos contribuyen a la calidad de la fruta, en cuanto a la modificación de color, sabor y aroma (Tomás-Baberán y Espín, 2001), los cultivares con mayor contenido de compuestos fenólicos tendrán mayor calidad. En las variedades utilizadas en esta Tesis Doctoral, el mayor contenido de fenoles totales se encontró en 'Lapins' seguida de 'Sweet Heart' y 'Sweet Late', si bien en todas ellas el contenido de fenoles totales es superior a los 80 mg 100 g<sup>-1</sup>. Las antocianinas son los compuestos fitoquímicos que confieren la calidad visual de las frutas y hortalizas, lo que contribuye a la presencia de los pigmentos rojos, azules y púrpuras

en los tejidos vegetales (Gao y Mazza, 1995). En cerezas, las antocianinas son los pigmentos que le confieren el color rojo característico y que también difieren en la concentración dependiendo del cultivar, con concentraciones que oscilan entre los 10-300 mg 100 g<sup>-1</sup> (Díaz-Mula et al., 2009). Las antocianinas predominantes en cereza son cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido, mientras que peonidin- y pelargonidin- 3-glucósido y 3-rutinósido se han encontrado en concentraciones muy bajas (Gonçalves et al, 2004; Mozetič et al., 2006; Usenik et al, 2008; Serrano et al., 2009; Martínez-Esplá et al., 2014; Picariello et al., 2016). En las variedades estudiadas en esta Tesis 'Lapins' mostró la mayor concentración ( $\approx 30$  mg 100 g<sup>-1</sup>) seguida de 'Sweet Heart' ( $\approx 15$  mg 100 g<sup>-1</sup>) y 'Sweet Late' ( $\approx 10$  mg 100 g<sup>-1</sup>) en el momento de recolección comercial.

Las cerezas también son ricas en ácidos fenólicos, siendo los más abundantes entre ellos los derivados del ácido hidroxicinámico tales como el ácido caféico y el ácido p-cumárico. Los compuestos fenólicos incoloros más comunes en las cerezas son el ácido neoclorogénico (ácido 3'-caffeoil quínico) y ácido 3'-p-coumaroil quínico (Mozetič et al., 2002, Chaovanalikit y Wolstad, 2004; Serrano et al., 2009; Martínez-Esplá et al., 2014; Picariello et al., 2016). Los hidroxicinamatos están recibiendo cada vez más atención por sus posibles efectos sobre la salud a través de su potente acción antioxidante, capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y sus propiedades quimiopreventivas (por ejemplo, efectos inhibidores sobre la promoción de tumores y la capacidad de bloquear la formación de compuestos mutagénicos tales como nitrosaminas) como se demuestra por los estudios *in vitro* (McCune et al., 2011). Las cerezas también contienen quercetina, un compuesto bioactivo fenólico que pertenece a una clase de flavonoides que están ampliamente distribuidos en una dieta rica basada en frutas y hortalizas con una potente actividad antioxidante (Boots et al., 2008). La capacidad de la quercetina para actuar como un eliminador de radicales libres sugiere que podría desempeñar un papel beneficioso en la reducción de las especies de oxígeno reactivo (ROS) (es decir, peróxido de hidrógeno, el anión superóxido) asociada con enfermedades crónicas tales como la enfermedad cardiovascular y el cáncer (Wilms et al., 2005). Como se ha visto en los experimentos realizados, las cerezas exhiben actividad antioxidante en ambos extractos hidrofílicos (AAT-H) y lipofílicos (AAT-L) mediante la medición de la capacidad de eliminación de radicales ABTS<sup>•+</sup>. Para todos los cultivares, la actividad AAT-H

fue mayor que la AAT-L, mostrando que los principales contribuidores a la actividad antioxidante son compuestos hidrófilos, tales como polifenoles, antocianinas y vitamina C. Las vitaminas liposolubles, A y E, también son antioxidantes, así como los tocoferoles y carotenoides, todos ellos compuestos lipofílicos que podrían contribuir a la AAT-L. Según el Instituto Nacional del Cáncer (2004), la cereza contiene cantidades importantes de carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno ( $38 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , de promedio) y luteína / zeaxantina ( $85 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , de promedio). Aunque los carotenoides son otros componentes bioactivos importantes en frutas (Valero y Serrano, 2010), casi no existen evidencias de su contenido en cereza. En un artículo reciente (Valero et al., 2011) en 2 variedades de cereza ('Prime Giant' y 'Cristalina') se encontraron concentraciones de carotenoides de  $0,61$  y  $1,06 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. De igual forma, Leong y Oey (2012) observaron niveles de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y  $\alpha$ -caroteno de  $0,02 \text{ mg g}^{-1}$  (peso seco) y de  $0,01 \text{ mg g}^{-1}$  (peso seco) para el licopeno y luteína. Sin embargo, se necesitan más estudios epidemiológicos para evaluar el papel de los compuestos bioactivos de cereza sobre resultados específicos de salud. Estos estudios deben incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta tras la ingesta de cereza con el fin de conocer mejor la dosis óptima de consumo de cereza necesaria para promover la modulación de biomarcadores específicos de la enfermedad.

Por otra parte, la cereza es un fruto muy perecedero y estos atributos de calidad, tanto organolépticos como nutritivos y funcionales disminuyen después de la recolección en un tiempo relativamente corto, lo que limita sus posibilidades de conservación y transporte a mercados lejanos. La extensión de la vida post-recolección de la cereza depende de tres factores: a) reducción de la pérdida de peso por deshidratación, b) ralentizar los procesos fisiológicos de la maduración y la senescencia, y c) evitar la aparición y la tasa de crecimiento microbiano. Para controlar estos tres factores, las herramientas principales son la refrigeración y controlar la humedad relativa (HR). La temperatura óptima para la cosecha y la manipulación de las cerezas es de entre  $10$  y  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (fuera de este rango de temperatura se observa más picaduras), mientras que la temperatura de almacenamiento óptima es de  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa de  $90$  a  $95 \%$  (Romano et al., 2006). Por lo tanto, el almacenamiento a bajas temperaturas es el principal tratamiento post-cosecha para reducir el metabolismo de la cereza, para mantener la calidad y prolongar la capacidad de almacenamiento en los frutos

perecederos y considerados no sensibles a daños por frío, como es el caso de la cereza. Existen algunas evidencias sobre los cambios en compuestos bioactivos y actividad antioxidante durante el almacenamiento en frío, aunque no se encuentra una tendencia general en todos los frutos. Así, una pérdida de compuestos beneficiosos para la salud (fenólicos y ácido ascórbico) se ha encontrado en uva de mesa, brócoli, granada y manzana (Serrano et al., 2011), en los que la pérdida de compuestos fenólicos fue altamente dependiente de la especie e incluso del cultivar. Sin embargo, se han encontrado aumentos en fitoquímicos, como fenoles y antocianinas, en un amplio rango de variedades de cereza durante el almacenamiento en frío, al igual que se muestra en las Publicaciones (1 y 2) y en los Artículos (1 y 2) de esta Tesis, lo que se relaciona con la evolución del proceso de maduración durante la conservación post-recolección, aunque en frutos sobre-maduros estos fitoquímicos ya disminuyen, debido a procesos de senescencia (Serrano et al., 2009; Valero et al., 2011). En otros casos se ha observado un comportamiento diferente en función de la temperatura de almacenamiento y del tipo de fenol. Así, Gonçalves et al. (2004) estudiaron los compuestos fenólicos hidroxycinamatos, antocianinas, flavonoides y flavano-3-oles en las variedades de 'Burlat', 'Saco', 'Cumbre' y 'Van' recolectadas en 2 estados de maduración diferentes y almacenados bajo diferentes condiciones de temperatura. Así, el contenido de ácidos fenólicos en general disminuyó con el almacenamiento a 1-2 °C y se incrementó con el almacenamiento a 15 °C. Los niveles de antocianinas se incrementaron a ambas temperaturas de almacenamiento, mientras que los flavonoles y contenidos flavano-3-ol se mantuvieron bastante constantes.

En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes estudios sobre el tratamiento con diferentes compuestos aplicados en post-recolección para mantener la calidad durante la conservación, así como estrategias pre-cosecha para incrementar los atributos de calidad de cerezas en el momento de la recolección, tales como ácido giberélico (Einhorn et al., 2013) y ácido oxálico (Martínez-Esplá et al., 2014), siendo los principales efectos un mayor tamaño, peso y firmeza del fruto, dando lugar también el ácido oxálico a incrementos en antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante.

El ácido salicílico (AS) es un regulador endógeno del crecimiento de las plantas, de naturaleza fenólica y está clasificado como promotor del crecimiento, jugando un papel importante en el desarrollo de la planta, especialmente bajo estrés biótico y abiótico (Hayat et

al., 2010). La mayoría de las aplicaciones de AS se han realizado como tratamientos post-cosecha y han sido dirigidas a aumentar la resistencia sistémica adquirida con beneficios en la reducción de las podredumbres causadas por ataque fúngico durante el almacenamiento, como se observó en fresa (Babalar et al., 2007), jínjol (Cao et al., 2013) y cereza (Chan et al., 2008). Además, estudios recientes han demostrado que el AS y sus derivados, ácido acetil salicílico (AAS) y salicilato de metilo (SaMe), aplicados como tratamientos post-cosecha, también influyen en los atributos de calidad del fruto. En este sentido, el AS retrasó el proceso de maduración post-cosecha y mantuvo mayores niveles en los atributos de calidad de albaricoques tratados en post-cosecha que en los controles (Wang et al., 2015). Del mismo modo, en granadas, tratamientos post-cosecha con AAS y SaMe redujeron significativamente los síntomas de daños por frío y mantuvieron algunos parámetros relacionados con la calidad del fruto, tales como firmeza, sólidos solubles totales y acidez total (Sayyari et al., 2011a; 2011b). Estos parámetros de calidad, los compuestos fitoquímicos y la actividad antioxidante también se mantuvieron en mayores niveles después de tratamientos post-cosecha de cerezas con AS y AAS (Valero et al., 2011). Sin embargo, existe escasa literatura sobre los efectos de tratamientos pre-cosecha con AS o sus derivados sobre los atributos de calidad del fruto. En este sentido, se ha publicado recientemente que tratamientos pre-cosecha con AS de racimos de uva incrementaron el tamaño, peso, color de la piel y firmeza de uvas de mesa en el momento de la recolección (Champa et al., 2015). Tratamientos con AS, de árboles de naranja 'Lane Late' y 'Valencia Late', a 8 o 9 mM, 10 días antes de la recolección, mantuvieron la firmeza del fruto, SST, AT, azúcares individuales y ácidos orgánicos durante el almacenamiento refrigerado (Ahmad et al., 2013).

En esta Tesis se ha encontrado que los tratamientos pre-cosecha de los cerezos con AS, AAS y SaMe aumentaron los parámetros de calidad anteriores y también los compuestos bioactivos (fenoles totales y antocianinas totales) al igual que la actividad antioxidante total (AAT) de ambas fracciones, hidrofílica (AAT-H) y lipofílica (AAT-L), en el momento de la recolección y se mantuvieron en niveles más elevados durante su conservación post-recolección (Giménez et al., 2014; Valverde et al., 2015).

Es bien sabido que el proceso global de maduración del fruto es una forma funcionalmente modificada de la senescencia, asociada con la acumulación de especies de

oxígeno reactivas (ROS), tales como radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidróxilo ( $OH^{\bullet}$ ), que son generados inevitablemente en las células de las plantas como consecuencia de su metabolismo normal (Hodges et al., 2004). Estas ROS son eliminadas en las células vegetales por compuestos antioxidantes (tales como fenoles, tocoferoles, carotenoides y ácido ascórbico) y por enzimas antioxidantes incluyendo principalmente superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y ascorbato peroxidasa (APX). Por tanto, el mayor contenido de compuestos antioxidantes y enzimas antioxidantes podría dar lugar a un retraso del proceso de maduración post-cosecha y a mantener los atributos de calidad del fruto durante periodos más largos. En este sentido, tratamientos post-cosecha con AS de mango y de *Annona squamosa* L. indujeron menores niveles de radicales libres superóxido y mayor actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y APX durante el almacenamiento si los comparamos con los frutos control (Ding et al., 2007; Mo et al., 2008). De forma similar, tratamientos post-cosecha con AS en melocotón incrementaron estas enzimas antioxidantes dando lugar a un retraso del proceso de maduración del fruto (Tareen et al., 2012).

La aplicación en pre-cosecha de AS, AAS o SaMe indujo mayor actividad de las enzimas CAT y POD en el momento de la recolección si comparamos con las cerezas control para las tres variedades. Durante el almacenamiento, la actividad de estas enzimas disminuyó significativamente en frutos control y tratados aunque los tratamientos con AS, AAS y SaMe dieron lugar a frutos con una actividad significativamente mayor de CAT y POD para todas las fechas de muestreo y variedades, obteniéndose el efecto principal con el tratamiento AAS. De forma similar, la actividad de las enzimas APX y SOD aumentó en el momento de la recolección debido a los tratamientos y durante el almacenamiento se observaron disminuciones de nuevo para las tres variedades, aunque las cerezas tratadas mostraron mayor actividad para todas las fechas de muestreo (Publicación 2 y Artículo 1) Los resultados obtenidos muestran una tendencia general en estas enzimas antioxidantes, es decir, disminuciones durante el almacenamiento las cuales también han sido observadas en otras variedades de cereza (Sharma et al., 2010; He et al., 2013), así como en pepino (Zhang et al., 2015) y frambuesa (Hassanpour, 2015), entre otros. La disminución de las enzimas antioxidantes daría lugar a la acumulación de diferentes ROS tales como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  o  $^1O_2$ , lo que contribuiría a la peroxidación

de los lípidos de membrana, daños en ADN y proteínas y a la aceleración de los procesos de senescencia (Hodges et al., 2004; Mondal et al., 2009).

En este sentido, se han publicado diferentes estrategias con el objetivo de incrementar estas enzimas antioxidantes durante el almacenamiento para retrasar los procesos de maduración y senescencia post-cosecha, siendo la mayoría de ellos aplicados como tratamientos post-cosecha. Así, recubrimientos con quitosano en cerezas aumentaron las actividades CAT y POD (Dang et al., 2010), así como los tratamientos de pre-enfriamiento por aplicación de vacío antes del almacenamiento (He et al., 2013), que estuvieron acompañados por un retraso de los procesos de maduración post-cosecha. Además, tratamientos post-cosecha de cerezas con hexanal o 1-metilciclopropeno dieron lugar a incrementos en la actividad SOD y a menores disminuciones en la actividad APX durante el almacenamiento en comparación con las cerezas control (Sharma et al., 2010). En otras frutas de hueso como el melocotón, las actividades SOD, CAT y POD también aumentaron gracias a tratamientos post-cosecha con AS, aunque en este fruto estas enzimas antioxidantes aumentaron durante el almacenamiento a 0 °C (Tareen et al., 2012). En albaricoque, la acumulación del radical superóxido durante el almacenamiento también se redujo cuando se aplicó AS a 1 o 2 mM debido a un incremento en la actividad SOD (Wang et al., 2015). AS también fue efectivo en el mantenimiento de mayores niveles de la actividad de las enzimas SOD, CAT y APX durante el almacenamiento de mango y de *Annona squamosa* L., que estuvieron acompañadas por un contenido menor de anión superóxido e inferior actividad lipoxigenasa (Ding et al., 2007; Mo et al., 2008). Además, frambuesas tratadas con gel de *Aloe vera* tuvieron mayor actividad SOD, APX y guayacol peroxidasa que aquellos frutos control durante el almacenamiento a 4 °C (Hassanpour, 2015). En aguacate, tratamientos con 1-MCP previnieron las disminuciones postclimáticas de las actividades POD, APX y CAT durante el almacenamiento post-cosecha a 20 °C, siendo responsable junto con la inhibición de etileno de un almacenamiento potencial más prolongado de los frutos tratados con 1-MCP (Zhang et al., 2013). Del mismo modo, tratamientos post-cosecha de pepinos con AS, solo o en combinación con quitosano, dieron lugar a mayores actividades de SOD, CAT, APX y GR durante el almacenamiento comparado con los pepinos control (Zhang et al., 2015). Sin embargo, en esta Tesis se muestra por primera vez que tratamientos pre-recolección de cerezas con AS, AAS o SaMe incrementaron las actividades

de CAT, POD, APX y SOD en la recolección y durante el almacenamiento post-cosecha, así como las concentraciones de compuestos antioxidantes (fenoles totales y antocianinas totales). Todo ello contribuiría a eliminar los ROS generados durante el proceso de maduración post-cosecha y a su vez a retrasar los procesos de maduración y senescencia post-cosecha y a extender la vida útil de las cerezas. Por tanto, estos resultados indican que los tratamientos pre-cosecha con los salicilatos pueden ser herramientas prometedoras para mejorar los atributos de calidad de las cerezas y los efectos beneficiosos para la salud del consumidor, en la recolección y conservación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los experimentos realizados en esta Tesis se incluyen en el proyecto AGL2012-35402/ALI, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y la Comisión Europea con fondos FEDER. Agradecemos su valiosa ayuda a “Fincas Toli S.L.” y “Cerezas Aitana” por la provisión de cerezas y el asesoramiento técnico recibido durante los experimentos.



## **Capítulo 7. Conclusiones**

---





## 7. CONCLUSIONES

1. Los tratamientos pre-cosecha con ácido salicílico (AS), ácido acetil salicílico (AAS) y salicilato de metilo (SaMe), a tres concentraciones (0,5, 1, y 2 mM), aplicados a cerezos en tres fechas clave del desarrollo del fruto, aumentaron algunos parámetros de calidad de la cereza relacionados con la aceptación por parte de los consumidores, como tamaño, peso y color, en el momento de la recolección. Sin embargo, los tratamientos no afectaron a la producción total del cultivo ni al proceso de maduración de las cerezas en el árbol, y todas ellas se recolectaron en la misma fecha basándose en el estado de madurez comercial, independientemente del tratamiento.
2. En el momento de la recolección también aumentaron parámetros de calidad, tales como firmeza y contenido en sólidos solubles totales. Los mejores resultados se obtuvieron con la concentración 1 mM de AAS y SaMe, y con la concentración de 0,5 mM para AS.
3. Los compuestos bioactivos y actividad antioxidante (AAT), así como la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, POX, SOD y APX) de los frutos tratados fueron mayores que en los frutos control en el momento de la recolección.
4. Se utilizó la mejor concentración de AS, AAS y SaMe para realizar los experimentos de almacenamiento. Los atributos de calidad (color, firmeza y sólidos solubles totales) fueron mayores en la recolección y se mantuvieron en niveles superiores durante el almacenamiento prolongado en comparación con los frutos control.
5. Los fenoles totales, las antocianinas totales y la AAT, se mantuvieron en mayores concentraciones al final del periodo de almacenamiento en los frutos tratados. Del mismo modo, la actividad de las enzimas antioxidantes también fue mayor en los frutos tratados con respecto a los controles.

6. La aplicación de SaMe en post-recolección en cerezas, a dos concentraciones (0,1 y 1 mM) mejoró los atributos de calidad, ya que redujeron la tasa de respiración, la pérdida de peso, el ablandamiento y la pérdida de acidez total, y el aumento el índice de madurez durante 20 días de almacenamiento refrigerado. Además, estos tratamientos mantuvieron en mayores concentraciones los fenoles totales, las antocianinas totales y la AAT-H.
7. Por tanto, los tratamientos con salicilatos, aplicados tanto en pre-cosecha como en post-cosecha, podrían ser considerados como una herramienta, segura y respetuosa con el medio ambiente, con potencial para mejorar los atributos de calidad de los frutos en el momento de la recolección y durante el almacenamiento, a la vez que aumentan la calidad nutricional y mejoran las propiedades beneficiosas para la salud del consumo de cerezas.



## Capítulo 8. Bibliografía

---





## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E. (1992). Ethylene in Plant Biology. San Diego: Academic Press.
- Abdi, N., Holford, P., McGlasson, W.B., Mizrahi, Y. (1997). Ripening behaviour and responses to propylene in four cultivars of Japanese type plums. *Postharvest Biology and Technology*, 12, 21-34.
- Acevedo, C.A., López, D.A., Tapia, M.J., Enrione, J., Skurtys, O., Pedreschi, F., Brown, D.I., Creixell, W., Osorio, F. (2012). Using RGB image processing for designating an alginate edible film. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1511-1520.
- Acked, J. (2002). Maintaining the post-harvest quality of fruits and vegetables. In *Fruit and Vegetable Processing*, ed. W. Jongem, 121-149. Abington: Woodhead Publishing Limited.
- Adams-Phillips, L., Barry, C., Giovannoni, J. (2004). Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*, 9, 331-338.
- Agar, I.T., Massantini, R., Hess-Pierce, B., Kader, A.A. (1999). Postharvest CO<sub>2</sub> and ethylene production and quality maintenance of fresh-cut kiwifruit slices. *Journal of Food Science*, 64, 433-440.
- Aguayo, E., Escalona, V.H., Artés, F. (2008). Effect of hot water treatment and various calcium salts on quality of fresh-cut 'Amarillo' melon. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 397-406.
- Agustí, M., Juan, M., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Almela, V. (2004). Calcium nitrite delays climacteric of persimmon fruit. *Annals of Applied Biology*, 144, 65-69.
- Agustí, M. (2008). Crecimiento y maduración del fruto. En: *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Eds). McGraw-Hill Interamericana. Madrid, p.p. 519-536.
- Ahmad, S., Singh, Z., Khan, A.S., Iqbal, Z. (2013). Pre-harvest application of salicylic acid maintain the rind textural properties and reduce fruit rot and chilling injury of sweet orange during cold storage. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 50, 559-569.

- Akbudak, B., Eris, A. (2004). Physical and chemical changes in peaches and nectarines during the modified atmosphere storage. *Food Control*, 15, 307-313.
- Alam, T., Goyal, G.K. (2006). Colour and pigment changes during modified atmosphere packaging storage of fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Review* 5, 16.
- Alandes, L., Quiles, A., Pérez-Munuera, I., Hernando, I. (2009). Improving the quality of fresh-cut apples, pears, and melons using natural additives. *Journal of Food Science*, 74, 590-596.
- Alvarez, A.L., (2000). Salicylic acid in machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology*, 44, 429-442.
- Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durzzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., Piskula, M.K. (2009). Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, S151–S183.
- Amorós, A., Zapata, P., Pretel, M.T., Botella, M.A., Serrano, M. (2003). Physico-chemical and physiological changes during fruit development and ripening of five loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars. *Food Science and Technology International*, 9, 43-49.
- Amorós, A., Pretel, M.T., Zapata, P.J., Botella, M.A., Romojaro, F., Serrano, M. (2008). Use of modified atmosphere packaging with microperforated polypropylene films to maintain postharvest loquat quality. *Food Science and Technology International*, 14, 95-103.
- Artés, F., Gómez, P.A., Artés-Hernández, F. (2006). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Review* 2006, 5:2.
- Asensi-Fabado, M.A., Munné-Bosh, S. (2010). Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends in Plant Science*, 15, 582–592.
- Aubert, C., Günata, Z., Ambid, C., Baumes, R. (2003). Changes in physicochemical characteristics and volatile constituents of yellow- and white-fleshed nectarines during maturation and artificial ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3083-3091.
- Aubert, C., Chanforan, C. (2007). Postharvest changes in physicochemical properties and volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca* L.) characterization of 28 cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3074-3082.



- Babalar, M., Asghari, M., Talaei, A., Khosroshahi, A. (2007). Effect of pre- and postharvest salicylic acid treatment on ethylene production, fungal decay and overall quality of Selva strawberry fruit. *Food Chemistry*, 105, 449-453.
- Bakshi, P., Masoodi, F.A., Chauhan, G.S., Shah, T.A. (2005). Role of calcium in postharvest life of temperate fruits: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 42, 1-8.
- Ban, T., Ishimaru, M., Kobayashi, S., Shiozaki, S., Goto-Yamamoto, N., Horiuchi, S. (2003). Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 586-589.
- Barry, C., Giovannoni, J. (2007). Ethylene and fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 143-159.
- Basiouny, F.M. (1996). Blueberry fruit quality and storability influenced by postharvest application of polyamines and heat treatments. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society*, 109, 269-272.
- Blankenship, S.M., Dole, J. M. (2003). 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 1-25.
- Beaudry, R.M. (1999). Effect of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 293-303.
- Beaudry, R.M. (2000). Responses of horticultural commodities to oxygen: limits to the expanded use of modified atmosphere packaging. *HortTechnology*, 10, 491-500.
- Beckers, G.J.M., Spoel, H., (2006). Fine-tuning plant defence signaling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, 8, 1-10.
- Bennett, A.B., Labavitch, J.M. (2008). Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Science*, 175, 130-136.
- Bennett, L.L., Rojas, S., Seefeldt, T. (2012). Role of antioxidants in the prevention of cancer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 4, 215-222.
- Ben-Yehoshua, S. (1987). Transpiration, water stress and gas exchange. In *Postharvest Physiology of Vegetables*, Ed. J. Weichmann, 113-170. New York: Marcel Dekker.

- Bernalte, M.J., Hernández, M.T., Vidal-Aragón, M.C., Sabio, E. (1999). Physical, chemical, flavor and sensory characteristics of two sweet cherry varieties grown in 'Valle del Jerte' (Spain). *Journal of Food Quality*, 22, 403–416.
- Berüter, J. (2004). Carbohydrate metabolism in two apple genotypes that differ in malate accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1011-1029.
- Birtic, S., Ginies, C., Causse, M., Renard, C.M.G.C., Page, D. (2009). Changes in volatiles and glycosides during fruit maturation of two contrasted tomato (*Solanum lycopersicum*) lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 591-598.
- Boots, A.W.; Haenen, G.R.; Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585, 325–337.
- Brady, C.J. (1987). Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 155-178.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bregoli, A.M., Scaramagli, S., Costa, G., Sabatini, E., Ziosi, V., Biondi, S., Torrigiani, P. (2002). Peach (*Prunus persica*) fruit ripening: aminoethoxyvinyl-glycine (AVG) and exogenous polyamines affect ethylene emission and flesh firmness. *Physiologia Plantarum*, 114, 472-481.
- 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, 311-340.
- Brummell, D.A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33, 103-119.
- Cai, C., Li, X., Chen, K.S., (2006). Acetylsalicylic acid alleviates chilling injury of postharvest loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. *European Food Research and Technology*, 223, 533-539.
- Candan, A.P., Graell, J., Larrigaudière, C. (2008). Roles of climacteric ethylene in the development of chilling injury in plums. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 107-112.
- Cantín, C.M., Crisosto, C.H., Day, K.R. (2008). Evaluation of the effect of different modified atmosphere packaging box liners on the quality and shelf life of 'Friar' plums. *HortTechnology* 18, 261–265.

- Cao, J. K., Yan, J. Q., Zhao, Y. M., Jiang, W. B. (2013). Effects of four pre-harvest foliar sprays with b-aminobutyric acid or salicylic acid on the incidence of postharvest disease and induced defence responses in jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) fruit after storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88, 338–344.
- Carreño, J., Almela, L., Martínez, A., Fernández-López, J.A. (1997). Chemotaxonomical classification of red table grapes based on anthocyanin profile and external colour. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30, 256-265.
- Cartea, M.E., Velasco, P. (2008). Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 213-229.
- Castillo, S., Navarro, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M., Martínez-Romero (2010). Antifungal efficacy of *Aloe vera* in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biology and Technology*, 57, 183–188.
- Cevallos-Casals, B.A., Byrne, D., Okie, W.R., Cisneros-Zevallos, L. (2006). Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. *Food Chemistry*, 96, 273-280.
- Cha, D.S., Chinnan, M.S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 44, 223-237.
- Champa, W. A. H., Gill, M. I. S., Mahajan, B. V. C., Arora, N. K. (2015). Preharvest salicylic acid treatments to improve quality and postharvest life of table grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Flame Seedless. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3607-3616.
- Chan, Z., Wang, Q., Xu, X., Meng, X., Qin, G., Li, B., Tian. (2008). Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics*, 8, 4791-4807.
- Chaovanalikit, A., Wrolstad, R. E. (2004). Total anthocyanin and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 69, FCT67-FCT72.

- Cho, Y.S., Yeum, K.J., Chen, C.Y., Beretta, G., Tang, G., Krinsky, N.Y., Yoon, S., Lee- Kim, Y.C., Blumberg, J.B., Russell, R.M. (2007). Phytonutrients affecting hydrophilic and lipophilic antioxidant activities in fruits, vegetables and legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 1096-1107.
- Cleland, C.F., Ajami, A. (1974). Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiology*, 54, 904-906.
- Conte, A., Scrocco, C., Lecce, L., Mastromatteo, M., Del Nobile, M. A. (2009). Ready-to-eat cherries: Study on different packaging systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 564-571.
- Crisosto, C.H., Lombard, P.B., Richardson, D.G., Tetley, R. (1992). Putrescine extends effective pollination period in 'Comice' pear (*Pyrus communis* L.) irrespective of post-anthesis ethylene levels. *Scientia Horticulturae*, 49, 211-221.
- Crisosto, C.H., Crisosto, G.M., Ritenour, M.A. (2002). Testing the reliability of skin color as an indicator of quality for early season 'Brooks' (*Prunus avium* L.) cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 147-154.
- Crisosto, C.H., Crisosto, G.M., Metheney, P. (2003). Consumer acceptance of 'Brooks' and 'Bing' cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 159-167.
- Crisosto, G.M., Crisosto, C.H., Echeverría, G., Puy, J. (2007). Segregation of plum and pluot cultivars according to their organoleptic characteristics. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 271-276.
- Cruz-Hernández, A., Paredes-López, O. (2012). Fruit Quality: New Insights for Biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 272-289.
- Dang, Q. F., Yan, J. Q., Li, Y., Cheng, X. J., Liu, C. S., Chen, X. G. (2010). Chitosan acetate as an active coating material and its effects on the storing of *Prunus avium* L. *Journal of Food Science*, 75, S125-S131
- D'Aquino, S., Palma, A., Fronteddu, F., Tedde, M. (2005). Effect of preharvest and postharvest calcium treatments on chilling injury and decay of cold stored Fortune mandarins. *Acta Horticulturae*, 682, 631-637.
- Deepa, N., Kaur, C., George, B., Singh, B., Kapoor, H.C. (2007). Antioxidant constituents in some red sweet pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes during maturity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 40, 121-129.

- Defilippi, B.G., San Juan, W., Valdés, H., Moya-León, M.A., Infante, R., Campos-Vargas, R. (2009). The aroma development during storage of Castlebrite apricots as evaluated by gas chromatography, electronic nose, and sensory analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 212-219.
- Delgado, J., Del Pilar Terrón, M., Garrido, M., Barriga, C., Paredes, S. D., Espino, J., Rodríguez, A.B. (2012). Systemic inflammatory load in young and old ringdoves is modulated by consumption of a Jerte Valley cherry-based product. *Journal of Medicinal Food*, 15, 707-712.
- De Souza, M., Silva-Ferreira, K., Paes-Chaves, J.B., Lopes-Teixeira, S. (2008). L-ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in papaya fruits (*Carica papaya*) with or without physiological skin freckles. *Scientia Agricola*, 65, 246-250.
- Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M. (2008). Changes in physicochemical and nutritive parameters and bioactive compounds during development and on-tree ripening of eight plum cultivars: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2499-2507.
- Díaz-Mula, H.M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Serrano, M. (2009). Sensory, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Science and Technology International*, 15, 535-543.
- Díaz-Mula, H.M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M., Valero, D. (2011). Modified atmosphere packaging of yellow and purple plum cultivars. 1. Effect on organoleptic quality. *Postharvest Biology and Technology*, 61, 103-109.
- Díaz-Mula, H.M., Serrano, M., Valero, D. (2012). Alginate coatings preserve Fruit quality and bioactive compounds during storage of sweet cherry fruit. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2990-2997.
- Ding, C. K., Wang, C. Y., Gross, K. C., Smith, D. L., (2001). Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock protein genes in tomatoes by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science*, 161, 1153-1159.
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C., Smith, D.L., (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214, 95–901.

- Ding, C. K., Wang, C. Y., (2003). The dual effects of methyl salicylate on ripening and expression of ethylene biosynthetic genes in tomato fruit. *Plant Science*, 164, 589-596.
- Ding, Z. S., Tian, S. P., Zheng, X. L., Zhou, Z. W., Xu, Y. (2007). Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 130, 112-121.
- Einhorn, T. C., Wang, Y., Turner, J. (2013). Sweet cherry fruit firmness and postharvest quality of late-maturing cultivars are improved with low-rate, single applications of gibberellic acid. *HortScience*, 48, 1010-1017
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Sliverman, P., Raskin, I., (1992). Signal molecule in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell*, 70, 879-886.
- Eryani-Raqeeb, A.A., Mahmud, T.M.M., Omar, S.R.S., Mohamed, A.R., Eryani, A.R.A. (2009). Effects of calcium and chitosan treatments on controlling Anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.). *International Journal of Agricultural Research*, 4, 53-68.
- Eshun, K., He, Q. (2004). *Aloe vera*: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries – a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 44, 91-96.
- Espada, J.L., Vega, C., Moneo, C. (2005). Comportamiento agronómico de variedades de cerezo. Resultados de 9 años de evaluación. *Informaciones Técnicas del Departamento de Agricultura y Alimentación del Gobierno de Aragón*. Num 153.
- Fanciullino, A.L., Cercós, M., Dhuikue-Mayer, C., Froelicher, Y., Talón, M., Ollitrault, P., Morillón, R. (2008). Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3628-3638.
- Fan-Chiang, H.J., Wrolstad, R.E. (2005). Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, 70, C198-C202.
- Ferguson, I.B., Boyd, L.M. (2001). Inorganic nutrients and fruit quality, In *Fruit Quality and its Biological Basis*, ed. M. Knee, 17- 45. Sheffield: Academic Press.

- Fernández-Panchón, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vivo* results to *in vitro* evidence. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 24, 649–671.
- Francis, F.J. (1989). Food Colorants: Anthocyanins. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 28, 273-314.
- Gao, L., Mazza, G. (1995). Characterization, quantification, and distribution of anthocyanins and colorless phenolic in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 343-346.
- García, J.M., Herrera, S., Morilla, A. (1996). Effects of postharvest dips in calcium chloride on strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 30-33.
- García, J.M., Medina, R.J., Olías, J.M. (1998). Quality of strawberries automatically packed in different plastic films. *Journal of Food Science*, 63, 1037-1041.
- García-Viguera, C., Zafrilla, P., Romero, F., Abellá, P., Artés, F., Tomás-Barberán, F.A. (1999). Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. *Journal of Food Science*, 64, 243-247.
- Gerasopoulos, D., Richardson, D.G. (1999). Storage temperature and fruit calcium alter the sequence of ripening events of 'd' Anjou' pears. *HortScience*, 34, 316-318.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Kader, S.A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4976-4982.
- Giménez, M. J., Valverde, J. M., Valero, D., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Castillo, S. (2014). Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chemistry*, 160, 226-232.
- Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 725-749.
- Giovannoni, J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16, S170-S180.
- Giovannoni, J. (2007). Fruit ripening mutants yields insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 283-289.

- Girard B., Kopp T.G. (1998). Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 471-476.
- Glowacz, M., Rees, D. (2015). Using jasmonates and salicylates to reduce losses within the fruit supply chain. *European Food Research and Technology*. doi 10.1007/s00217-015-2527-6.
- Goff, S., Klee, J. (2006). Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value. *Science*, 311, 815-819.
- Gong, Y., Fan, X., Mattheis, J.P. (2002). Responses of 'Bing' and 'Rainier' sweet cherries to ethylene and 1-methylcyclopropene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127, 831-835.
- Gonçalves, B., Landbo, A.K., Knudse, D., Silva, A.P., Moutinho-Pereira J., Rosa E., Meyer, A.S. (2004). Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52, 523-530.
- Gonçalves, B., Silva, A.P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., Rosa, E., Meyer, A.S. (2007). Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 103, 976-984.
- González-Aguilar, G.A., Buta, J.G., Wang, C.Y. (2003). Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya 'Sunrise'. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 361-370.
- González-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., Carbonneau A., Moutounet, M. (2004). Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *AnalyticaChimicaActa*, 513, 191-196.
- Goulao, L.F., Oliveira, C.M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 4-25.
- Grierson, D. (2013). Ethylene and the Control of Fruit Ripening. En: *The molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*. Seymour, G.B, Poole, M., Giovannoni, J.J., Tucker, G.A. (Eds). Wiley-Blackwell, p.p. 43-74
- Guan, J.F., Dou, S. (2010). The effect of MAP on quality and browning of cold-stored plum fruits. *Journal of Food and Agriculture and Environment*, 8, 113–116.



- Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P.J., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M. (2006). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 235-242.
- Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P.J., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D. (2007). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 1. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 23-27.
- Han, T., Wang, Y., Li, L., Ge, X. (2003). Effect of exogenous salicylic acid on postharvest physiology of peaches. *Acta Horticulturae*, 628, 383-389.
- Hassanpour, H. (2015). Effect of *Aloe vera* gel coating on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activities and decay in raspberry fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 495-501.
- Harper, J.R., Balke, N.E., (1981). Characterization of the inhibition of K<sup>+</sup> absorption in oats roots by salicylic acid. *Plant Physiology*. 68, 1349-1353.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 68, 14-25.
- He, S. Y., Zhang, G. C., Yu, Y. Q., Li, R. G., Yang, Q. R. (2013). Effects of vacuum cooling on the enzymatic antioxidant system of cherry and inhibition of surface borne pathogens. *International Journal of Refrigeration*, 36, 2387-2394.
- Heidel, A. J., Clarke, J. D., Antonovics, J., Dong, X. (2004). Fitness costs of mutations affecting the systemic acquired resistance pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 168, 2197-2206.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Ocio, M.J., Gavara, R. (2006). Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*, 39, 247-253.
- Hodges, D.M., Lester, G.E., Munro, K.D., Toivonen, P.M.A. (2004). Oxidative stress: Importance for postharvest quality. *Horticultural Science*, 39, 924-929.
- Huang, R., Xia, R., Lu, Y., Hu, L., Xu, Y., (2008). Effect of pre-harvest salicylic acid spray treatment on post-harvest antioxidant in the pulp and peel of 'Cara cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 229-236.

- Jaime, P., Salvador, M. L., Oria, R. (2001). Respiration rate of sweet cherries: 'Burlat', 'Sunburst' and 'Sweetheart' cultivars. *Journal of Food Science*, 66, 43–47.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Terry, L.A. (2001). 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. *Postharvest Biology and Technology*, 23, 227-232.
- Jomori, M.L.L., Kluge, R.A., and Jacomino, A.P. (2003). Cold storage of "Tahiti" lime treated with 1-methylcyclopropene. *Scientia Agricola*, 60, 785-788.
- Kader, A.A., Zagory, D., Kerbel, E.L. (1989). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Review on Food Science and Nutrition*, 28, 1-30.
- Kader, A.A. (2002). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Regents of the University of California, Division of Agricultural and Natural Resources, Oakland, CA, USA.
- Kadir, S.A. (2004). Fruit quality at harvest of "Jonathan" apple treated with foliarly-applied calcium chloride. *Journal of Plant Nutrition*, 27, 1991-2006.
- Kahlke, C. J., Padilla-Zakour, O. I., Cooley, H. J., Robinson, R. L. (2009). Shelf-life and marketing window extension in sweet cherries by the use of modified atmosphere packaging. *New York Fruit Quarterly*, 17, 21-24.
- Kang, G.Z., Wang, Z.X., Sun, G.C., (2003). Participation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in enhancement of cold chilling by salicylic acid in banana seedlings. *Acta Botanica Sinica*, 45, 567-573.
- Kappel, E., Toivonen, P., McKenzie, K. L., Stan, S. (2002). Storage characteristics of new sweet cherry cultivars. *HortScience*, 37, 139–143.
- Kato, M., Hayakawa, Y., Hyodo, H., Ikoma, Y., Yano, M. (2000). Wound-induced ethylene synthesis and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiology*, 41, 440–447.
- Kaur, D., Sharma, R., Wani, A.A., Gill, B.S., Sogi, D.S. (2006). Physicochemical changes in seven tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars during ripening. *International Journal of Food Properties*, 9, 747–757.
- Khan, W., Prithviraj, B., Smith, D.L., (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology*, 160, 485-492.

- Khan, A.S., Singh, Z., Abbasi, N.A., Swinny, E.E. (2008). Pre- or post-harvest applications of putrescine at low temperature storage affect fruit ripening and quality of 'Angelino' plum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1686-1695.
- Khan, A.S., Singh, Z., and Swinny, E.E. (2009). Postharvest application of 1-methylcyclopropene modulates fruit ripening, storage life and quality of 'Tegan Blue' Japanese plum kept in ambient and cold storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1271-1280.
- Klessig, D.F., Malamy, J., (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology*, 26, 1439-1458.
- Kondo, S., Ponrod, W., Sutthiwal, S. (2003). Polyamines in developing mangosteens and their relationship to postharvest chilling injury. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72, 318-320.
- Kortstee, A.J., Appeldoorn, N.J.G., Oortwijn, M.E.P., Visser, R.G.F. (2007). Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta*, 226, 929-939.
- Kramer, G. F., Wang, C. Y., Conway, W. S. (1991). Inhibition of softening by polyamine application in 'Golden Delicious' and 'McIntosh' apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 813-817.
- Krumbein, A., Peters, P., Brückner, B. (2004). Flavour compounds and a quantitative descriptive analysis of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) of different cultivars in short-term storage. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 15-28.
- Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M.A., Tiburcio, A.F. (1997). Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Sciences*, 2, 124-130.
- Kurz, C., Carle, R., Schieber, A. (2008). HPLC-DAD-MS characterization of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chemistry*, 110, 522-530.
- Landete, J.M. (2012). Updated knowledge about polyphenols: Functions, bioavailability, metabolism, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 936-948.
- Lange, D.L. (2000). New film technologies for horticultural products. *HortTechnology*, 10, 487-490.

- Lara, I., García, P., Vendrell, M. (2004). Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, 34, 331-339.
- Lasbrook, C.C. (2005). New insights into cell disassembly during fruit ripening. *Stewart Postharvest Review 2005*, 3:2.
- Lee, H.I., Raskin, I., (1998). Glucosylation of salicylic acid in *Nicotianatabacum* Cv. Xanthi-nc. *Phytopathology*, 88, 692-697.
- Lee, H.I., Raskin, I., (1999). Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 36637-36642.
- 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.
- Lenucci, M.S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G., Dalessandro, G. (2006). Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2606-2613.
- Leong, S.Y., Oey, I. (2012). Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chem.* 133, 1577-1587.
- Lester, G.E. (2000). Polyamines and their cellular anti-senescence properties in honeydew muskmelon fruit. *Plant Science*, 160, 105-112.
- Lobit, P., Génard, M., Wu, B.H., Soing, P., Habib, R. (2003). Modelling citrate metabolism in fruits: responses to growth and temperature. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2489-2501.
- Lopes-da-Silva, F., Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C. (2007). Stability of pelargonidin 3-glucoside in model solutions in the presence and absence of flavanols. *American Journal of Food Technology*, 2, 602-617.
- Lozano, M., Vidal-Aragón, M.C., Hernández, M.T., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J. García, J., Velardo, B. (2009). Physicochemical and nutritional properties and volatile constituents of six plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars. *European Food Research and Technology*, 228, 403-410.

- Luo, Z., Chen, C., Xie, J. (2011). Effect of salicylic acid treatment on alleviating postharvest chilling injury of 'Qingnai' plum fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 62, 115-120.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14, 257-269.
- Maftoonazad, N., Ramaswamy, H.S., Marcotte, M. (2008). Shelflife extension of peaches through sodium alginate and methyl cellulose edible coatings. *International Journal of Food Science and Technology*. Volume 43, 951-957.
- Mahmud, T.M.M., Eryani-Raqeeb, A.A., Omar, S.S.R., Mohamed, Z.A.R., Eryani, A.A.R. (2008). Effects of different concentrations and applications of calcium on storage life and physicochemical characteristics of papaya (*Carica papaya* L.). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3, 526-533.
- Maiani, G., Castón, M.J.P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorenzo, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behsnilian, D., Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53 (SUPPL. 2): 194-218.
- Malik, A.U., Singh, Z., Dhaliwal, S.S. (2003). Exogenous application of putrescine affects mango fruit quality and shelf life. *Acta Horticulturae*, 628, 121-127.
- Malik, A.U., Singh, Z. (2005). Pre-storage application of polyamines improves shelf-life and fruit quality of mango. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80, 363-369.
- Malik, A.U., Singh, Z. (2006). Improved fruit retention, yield and fruit quality in mango with exogenous application of polyamines. *Scientia Horticulturae*, 110, 167-174.
- Manganaris, G.A., Vasilakakis, M., Diamantidis, G., Mignani, I. (2007). The effect of postharvest calcium application on tissue calcium concentration, quality attributes incidence of flesh browning and cell wall physicochemical aspects of peach fruits. *Food Chemistry*, 100, 1385-1392.
- Martín-Diana, A.B., Rico, D., Frías, J.M., Barat, J.M., Henehan, G.T.M., Barry-Ryan, C. (2007). Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally

- processed fruits and vegetables: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 210-218.
- Martínez-Esplá, A., Zapata, P.J., Valero, D., García-Viguera, C., Castillo, S., Serrano, M. (2014). Preharvest application of oxalic acid increased fruit size, bioactive compounds, and antioxidant capacity in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3432-3437.
- Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., Martínez-Sánchez, F., Riquelme, F. (1999). Effects of post-harvest putrescine and calcium treatments on reducing mechanical damage and polyamines and abscisic acid levels during lemon storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1589-1595.
- Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., Burló, F., Carbonell, A., Burgos, L., Riquelme, F. (2000). Exogenous polyamines and gibberellic acid effects on peach (*Prunus persica* L.) storability improvement. *Journal of Food Science*, 65, 288-294.
- Martínez-Romero, D., Serrano, M., Carbonell, A., Burgos, L., Riquelme, F., Valero, D. (2002). Effects of postharvest putrescine treatment on extending shelf life and reducing mechanical damage in apricot. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 1706-1712.
- Martínez-Romero, D., Dupille, E., Guillen, F., Valverde, J.M., Serrano, M., Valero D. (2003a). 1-Methylcyclopropene increases storability and shelf life in climacteric and non climacteric plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4680-4686.
- Martínez-Romero, D., Guillén, F. Castillo, S. Valero, D., Serrano, M. (2003b). Modified atmosphere packaging maintains quality of table grape. *Journal of Food Science* 68, 1838-1843.
- Martínez-Romero, D., Albuquerque, N., Valverde, J.M., Guillén, F., Castillo, S., Valero, D., Serrano, M. (2006). Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by *Aloe vera* treatment: A new edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 93-100.

- Martínez-Romero, D., Bailén, G., Serrano, M., Guillén, F., Valverde, J. M., Zapata, P., Castillo, S., Valero, D. (2007). Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition of the ethylene action. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 47, 543-560.
- Martínez-Téllez, M.A., Ramos-Clamont, M.G., Gardena, A.A., Vargas-Arispuro, I. (2002). Effect of infiltrated polyamines on polygalacturonase activity and chilling injury responses in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295, 98-101.
- Mato, I., Suárez-Luque, S., Huidobro, J.F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38, 1175-1188.
- Mattheis, J.P., Buchanan, D.A., Fellman, J.K. 1992. Volatile compounds emitted by sweet cherries (*Prunus avium* cv. Bing) during fruit development and ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 471-474.
- McCune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollins, N. R., Thomson, C. A. (2011). Cherries and health: a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 51, 1-12.
- Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A. (2011). Fruit shelf life and potential for its genetic improvement. In: Jenks MA, Bebeli PJ. eds. *Breeding for fruit quality*. Oxford: John Wiley and Sons, 81-104.
- Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valero, D. (2006). Prestorage heat treatment to maintain nutritive and functional properties during postharvest cold storage of pomegranate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8495-8500.
- Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D. (2007). Pre-storage application of polyamines by pressure or immersion improves shelf-life of pomegranate stored at chilling temperature by increasing endogenous polyamine levels. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 26-33.
- Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R., Xie, J. Li, W. (2008). Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2693-2699.

- Mondal, K., Malhotra, S. P., Jain, V., Singh, R. (2009). Oxidative stress and antioxidant systems in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15, 327-334
- Monselise, S.P. (1986). *CRC Handbook of Fruit Set and Development*. Boca Raton: CRC Press Inc.
- Moodley, R.S., Govinden, R., Odhav, B. (2002). The effect of modified atmosphere and packaging on patulin production in apples. *Journal of Food Protection*, 65, 867-871.
- Moreno, D.A., Carvajal, M., Lopez-Berenguer, C., Garcia-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1508–1522.
- Moss, M.O. (2008). Fungi, quality, and safety issues in fresh fruits and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1239-1243.
- Mozetič, B., Trebše, P., Hribar, J. (2002). Determination and quantisation of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia). *Food Technology and Biotechnology*, 40, 207-212.
- Mozetič B.; Simčič M.; Trebše P. (2006). Anthocyanins and hidroxicinnamic acids of Lambert Compact cherries (*Prunus avium* L.) after cold storage and 1-methylcyclopropene treatments. *Food Chem.* 97, 302-309.
- Nair, S., Singh, Z. (2004). Chilling injury in mango fruit in relation to biosynthesis of free polyamines. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79, 515-522.
- Nielsen, T., Leufvén, A. (2008). The effect of modified atmosphere packaging on the quality of Honeoye and Korona strawberries. *Food Chemistry*, 107, 1053-1063.
- Nogueroles, J. (2005). Cherry cultivation in Spain. *Acta Horticulturae*, 667, 293-302.
- Orak, H.H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlation. *Scientia Horticulturae*, 111, 235-241.
- Ortiz, A., Echeverria, G., Graell, J., Lara, I. (2009). Calcium dips enhance volatile emission of cold-stored "Fuji Kiku-8" apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4931-4938.



- Padilla-Zakour, O. I., Ryona, I., Cooley, H. J., Robinson, T. L., Osborne, J., Freer, J. (2007). Shelf-life extension of sweet cherries by field management, post-harvest treatments, and modified atmosphere packaging. *New York Fruit Quarterly*, 15, 3–6
- Paksasorn, A., Hayasaka, T., Matsui, H., Ohara, H., Hirata, N. (1995). Relationship of polyamine content to ACC content and ethylene evolution in Japanese apricot fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 63, 761-766.
- Paladines, D., Valero, D., Valverde, J.M., Díaz-Mula, H.M., Serrano, M., Martínez-Romero, D. (2014). The addition of rosehip oil improves the beneficial effect of *Aloe vera* gel on delaying ripening and maintaining postharvest quality of several stonefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 92, 23-28.
- Pandey, S., Ranade, S.A., Nagar, P.K., Kumar, N. (2000). Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Bioscience*, 25, 291-299.
- Pandit, S.S., Chiley, H.G., Kulkarni, R.S., Pujari, K.H., Giri, A.P., Gupta, V.S. (2009). Cultivar relationships in mango based on fruit volatile profile. *Food Chemistry*, 114, 363-372.
- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V.J., Kirby, A.R., Quesada, M.A., Mercado, J.A (2014). Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany* 114, 1375-1383.
- Pareek, S., Valero, D., Serrano, M. (2015). Postharvest biology and technology of pomegranate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2360-2379.
- Park, Y.S., Jung, S.T., Kang, S.G., Drzewiecki, J., Namiesnik, J., Haruenkit, R., Barasch, D., Trakhtenberg, S., Gorinstein, S. (2006). In vitro studies of polyphenols, antioxidants and other dietary indices in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57, 107-122.
- Park, H.J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 254-260.
- Paul, V., Pandey, R., Srivastava, G.C. (2012). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene—An overview. *Journal and Food Science and Technology*, 49, 1-21.

- Paull, R.E., Chen, N.J. (2000). Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 21-37.
- Pech, J.C., Bouzayen, M., Latché, A. (2008). Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science*, 175, 114-120.
- Pech, J.C, Latché, A., Bouzayen, M. (2010). Ethylene biosynthesis. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones: biosynthesis, transduction, action*, 3rd ed. Springer, Dordrecht, 115–136.
- Pesis, E., Ackerman, M., Ben-Arie, R., Feygenberg, O., Feng, X., Apelbaum, A., Goren, R., Prusky, D. (2002). Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 171-181.
- Pérez-Vicente, A., Martínez-Romero, D., Carbonell, A., Serrano, M., Riquelme, F., Guillén, F., Valero, D. (2002). Role of polyamines in extending shelf life and the reduction of mechanical damage during plum (*Prunus salicina* Lindl) storage. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 25–32.
- Perkins-Veazie, P., Collins, J.K., Pair, S.D., Roberts, W. (2001). Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 983-987.
- Petracek, P. D., Joles, D. W., Shirazi, A., Cameron, A. C. (2002). Modified atmosphere packaging of sweet cherry (*Prunus avium* L., cv. Sams) fruit: Metabolic responses to oxygen, carbon dioxide, and temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 259–270.
- Picariello, G., De Vito, V., Ferranti, P., Paolucci, M., Volpe, M.G. (2016). Species- and cultivar-dependent traits of *Prunus avium* and *Prunus cerasus* polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 50-57.
- Picchioni, G.A., Watada, A.E., Conway, W.S., Whitaker, B.D., Sams, C.E. (1998). Postharvest calcium infiltration delays membrane lipid catabolism in apple fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2452-2457.
- Pino, J.A., Mesa, J., Muñoz, Y., Martí, M.P., Marbot, R.J. (2005). Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2213-2223.

- Pirrello, J., Regad, F., Latché, A., Pech, J.C., Bouzayen, M. (2009). Regulation of Sciences, Nutrition and Natural Resources, 4, Issue 9.
- Popova, L., Pancheva, T., Uzunova, A. (1997). Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23, 85-93.
- Prasanna, V., Prabha, T.N., Tharanathan, R.N. (2007). Fruit ripening phenomena. An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 1-19.
- Pretel, M.T., Serrano, M., Martínez, G., Riquelme, F., Romojaro, F. (1993). Influence of films of different permeability on ethylene synthesis and ripening of MA-Packaged apricots. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 26, 8–13.
- Pretel, M.T., Serrano, M., Amorós, A., Romojaro, F. (1999). Ripening and ethylene biosynthesis in controlled atmosphere stored apricots. *European Food Research and Technology*, 209, 130–134.
- Prusky, D., Lichter, A. (2008). Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 281-289.
- Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W., Meeuse, B.J.D., (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and nonthermogenic plants. *Annals of Botany*, 66, 376–383.
- Raskin, I., (1992a). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 439-463.
- Raskin, I., (1992b). Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology*, 99, 799-803.
- Recasens, I., Benavides, A., Puy, J., Casero, T. (2004). Pre-harvest calcium treatments in relation to the respiration rate and ethylene production of "Golden Smoothie" apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 765-771.
- Remón, S., Ferrer, A., Marquina, P., Burgos, J., Oria, R. (2000). Use of modified atmospheres to prolong the postharvest life of Burlat cherries at two different degrees of ripeness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1545–1552.
- Remón, S., Venturini, M.E., López-Buesa, P., Oria, R. (2003). Burlat cherry quality after long range transport: optimisation of packaging conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 4, 425-434.

- Remón, S., Ferrer, A., López-Buesa, P., Oria, R. (2004). Atmosphere composition effects on Burlat cherry colour during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 140–146.
- Rhodes, M.J.C. (1980). The maturation and ripening of fruits. In: *Senescence in Plants*, ed.K.V. Thimann, 157-205. Boca Raton: CRC Press.
- Rocha, A. M. C. N., Morais, A. M. M. B. (2001). Influence of controlled atmosphere storage on polyphenoloxidase activity in relation to colour changes of minimally processed Jonagored apple. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 425–432.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura, M. (2004). *Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus Technical Monograph 2. Brasil: Harvestplus.
- Romano, G.S.; Cittadini, E.D.; Pugh, B.; Schouten, R. (2006). Sweet cherry quality in the horticultural production chain. *Stewart Postharvest Review*, 1:1 (doi 10.2212/spr.2006.6.2).
- Ruduś, I., Sasiak, M., Kepczyński, J. (2013). Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 295–307.
- Safizadeh, M.R., Rahemi, M., Tafazoli, E., Eman, Y. (2007). Influence of postharvest vacuum infiltration with calcium on chilling injury, firmness and quality of Lisbon lemon fruit. *American Journal of Food Technology*, 2, 388-396.
- Sandhya. (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: current status and future needs. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 43, 381-392.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Serrano, M., Valero, D., (2009). Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in store pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 152-154.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D. (2011a). Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chemistry*, 124, 964-970.
- Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz-Mula, H., Serrano, M. (2011b). Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds

- and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 136-142.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K., (2000). Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulator*, 30, 157-161.
- Serradilla, M.J., Martín, A., Hernández, A., López-Corrales, M., Lozano, M., Córdoba, M.G. (2010). Effect of comercial ripening stage and postharvest storage on microbial an aroma changes of 'Ambrunés' sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9157-9163.
- Serradilla, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., López-Corrales, M., Córdoba, M.D.G. (2012). Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain). *FoodChemistry*, 133, 1551-1559.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M.C., Martínez, G., Riquelme, F., Pretel, M.T., Romojaro, F. (1996). Review: Role of polyamines in chilling injury of fruit and vegetables. *Food Science and Technology International*, 2, 195-199.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M.C., Pretel, M.T., Riquelme, F., Romojaro, F. (1997). Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and abscisic acid levels caused by chilling injury in pepper fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1668-1672.
- Serrano, M., Amorós, A., Pretel, M.T., Martínez-Madrid, M.C., Romojaro, F. (2002). Effect of calcium deficiency on melon (*Cucumis melo* L.) texture and glassiness incidence during ripening. *Food Science and Technology International*, 8, 147-154.
- Serrano M., Martínez-Romero D., Guillén F., Valero D. (2003). Effects of exogenous putrescine on improving shelf life of four plum cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 259-271.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Valero, D. (2004a). Role of calcium and heat treatments in alleviating physiological changes induced by mechanical damage in plum. *Postharvest Biology and Technology*, 34, 155-157.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Valero, D. (2004b). Effect of preharvest sprays containing calcium, magnesium and titanium on the quality

- of peaches and nectarines at harvest and during postharvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1270-1276.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Zuzunaga, M., Riquelme, F., Valero, D. (2004c). Calcium, polyamine and gibberellin treatments to improve postharvest fruit quality. In *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*. Vol. 4. Postharvest Treatment and Technology, eds. R. Dris, S.M. Jain, 55-68. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D. (2005a). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2741-2745.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Valero, D. (2005b). The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 115-123.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., Valero, D. (2006). Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 61-68.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Valero, D. (2008a). The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 464-471.
- Serrano, M., Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D. (2008b). Post-harvest ripening of tomato. In *Tomatoes and Tomato Products*, eds. V.R. Preedy, R.R. Watson, 67-84. Enfield: SciencePublishers.
- Serrano, M., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D. (2009). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2741-2745.
- Serrano, M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valero, D. (2010). Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper

- development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. *Food Chemistry*, 118, 497-503.
- Serrano, M., Díaz-Mula, H., Valero, D. (2011). Antioxidant compounds in fruits and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Stewart Postharvest Review* 2011, 1:1.
- Sharma, M., Jacob, J. K., Subramanian, J., Paliyath, G. (2010). Hexanal and 1-MCP treatments for enhancing the shelf life and quality of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 125, 239-247.
- Sharon-Asa, L., Shalit, M., Frydman, A., Bar, E., Holland, D., Or, E., Lavi, U., Lewinsohn, E., Eyal, Y. (2003). Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and development regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. *The Plant Journal*, 36, 664-674.
- Shen, J., Wilmot, K.A., Ghasemzadeh, N., Molloy, D.L., Burkman, G., Mekonnen, G., Gongora, M.C., Quyyumi, A.A., Sperling, L.S.(2015). Mediterranean Dietary Patterns and Cardiovascular Health. *Annual Review of Nutrition*, 35 (1), pp. 425-449.
- Shewfelt, R.L. (1999). What is quality? *Postharvest Biology and Technology*, 15, 197-200.
- Shiratake, K., Martinola, E. (2007). Transporters in fruit vacuoles. *Plant Biotechnology*, 24, 127-133.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Metraux, J.P., Raskin, I. (1995). Salicylic acid in rice, biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiology*, 108, 633-639.
- Singh, S.P., Rao, D.V.S. (2005). Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on the alleviation of chilling injury and dietary antioxidants levels in 'Solo' papaya during low temperature storage. *European Journal of Horticultural Science*, 70, 246-252.
- Sisler, E. C., Serek, M. (1997). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level. Recent developments. *Physiologia Plantarum*, 100, 577-582.

- Sivakumar, D., Korsten, S. (2006). Influence of modified atmosphere packaging and postharvest treatments on quality retention of litchi cv. Mauritius. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 135-142.
- Song, J., Forney, C.F. (2008). Flavour volatile production and regulation in fruit. *Canadian Journal of Plant Science*, 88, 537-550.
- Spotts, R.A., Cervantes, L.A., Fecteau, T.J. (2002). Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packaging, and cold storage temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 251-257.
- Srinivasa, P.C., Tharanathan, R.N. (2007). Chitin/Chitosan—Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Reviews International*, 23, 53–72.
- Stintzing F.C., Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 19-38.
- Sun, S.Y., Jiang, W.G., Zhao, Y.P. (2010). Characterization of aroma-active compounds in five sweet cherry cultivars grown in Yantai (China). *Flavour Fragrance Journal*, 25, 206-213.
- Symons, G.M., Chua, Y.J., Ross, J.J., Quittenden, L.J., Davies, N.W., Reid, J.B. (2012). Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4741-4750.
- Taiz, L., Zeiger, E. (eds) (2006). *Fisiología Vegetal. Volumen 2: Crecimiento y desarrollo*. Publicacions de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana. ISBN 978-84-8021-600-5.
- Tareen, M.J., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A., (2012). Postharvest application of salicylic acid enhanced antioxidant enzyme activity and maintained quality of peach cv. 'Flordaking' fruit during storage. *Scientia Horticulturae*, 142, 221-228.
- Tian, S. P., Fan, Q., Xu, Y., Wang, Y. S., Jiang, A. (2001). Evaluation of the use of high carbon dioxide concentrations and cold storage to control *Monilinia fructicola* on sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 53–60.
- Tian, S. P., Jiang, A. L., Xu, Y., Wang, Y. S. (2004). Responses of physiology and quality of sweet cherry fruit to different atmosphere in storage. *Food Chemistry*, 87, 43–49.



- Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B., Kader, A.A. (2001). HPLD-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4748-4760.
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853-876.
- Topuz, A., Ozdemir, F. (2007). Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 596-602.
- Torrigiani, P., Bregoli, A.M., Ziosi, V., Scaramagli, S., Ciriaci, T., Rasori, A., Biondi S., Costa, G. (2004). Pre-harvest polyamine and aminoethoxyvinylglycine (AVG) applications modulate fruit ripening in Stark Red Gold nectarines (*Prunus persica* L. Batsch.). *Postharvest Biology and Technology*, 33, 293-308.
- Tucker, G., Robards, K. (2008). Bioactivity and structure of biophenols and mediators of chronic diseases. *Critical Review in Food Science and Nutrition Environment*, 3, 10-17.
- Usenik V., Fabčič J., Štampar F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 107, 185-192.
- Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Riquelme, F. (1998). Influence of postharvest putrescine and calcium on endogenous polyamines, firmness, and abscisic acid in lemon (*Citrus lemon* L. Burn Cv Verna). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2102-2109.
- Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Riquelme F. (1999). Polyamine roles on the post-harvest of fruits. A review. In *Recent Research Developments in Agricultural, Food Chemistry*, ed. S. Pandalai, 39-55. Trivandrum: Research Signpost.
- Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M. (2002a). The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 228-234.

- Valero, D., Pérez-Vicente, A., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Serrano, M. (2002b). Plum storability improved after calcium and heat treatments: Role of polyamines. *Journal of Food Science*, 67, 2571-2575.
- Valero, D., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Guillén, F., Serrano, M. (2003). Quality improvement and extension of shelf life by 1-methylcyclopropene in plum as affected by ripening stage at harvest. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 339-348.
- Valero, D., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Guillén, F., Castillo, S., Serrano, M. (2004). Could the 1-MCP treatment effectiveness on plum be affected by packaging? *Postharvest Biology and Technology*, 34, 295-303.
- Valero, D., Valverde, J.M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., Serrano, M. (2006). The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 317-327.
- Valero, D., Serrano, M. (2010). *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*. Boca Raton: CRC Press-Taylor and Francis.
- Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M. (2011). Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5483-5489.
- Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M. (2013). Effects of alginate edible coating on preserving fruit quality in four plum cultivars during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 77, 1-6.
- Valero, D., Serrano, M. (2013). Growth and ripening stage at harvest modulates postharvest quality and bioactive compounds with antioxidant activity. *Stewart Postharvest Review* 2013, 3:5.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Croun, M.T.C., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.

- Valverde, J.M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., Serrano, M. (2005). Novel edible coating based on *Aloe vera* gel to maintain table grape quality and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7807-7813.
- Valverde, J.M., Giménez, M.J., Guillén, F., Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M. (2015). Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees increase antioxidant systems in fruit at harvest and during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 106-113.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, J., González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 48, 496-511.
- Venturini, M.E., Oria, R., Blanco, D. (2002). Microflora of two varieties of sweet cherries: Burlat and Sweetheart. *Food Microbiology*, 19, 15-21.
- Villatoro, C., Altisent, R., Echeverría, G., Graell, J., López, M.T., Lara, I. (2008). Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of 'Pink Lady' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 286-295.
- Vizzotto, M., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H., Ramming, D.W., Okie, W.R. (2007). Large variation found in the phytochemical and antioxidant activity of peach and plum germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132, 334-340.
- Wang, S.Y., Lin, H.S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.
- Wang, C.Y. (2010). Alleviation of Chilling Injury in Tropical and Subtropical Fruits. *Acta Horticulturae*, 864, 267-273.
- Wang, S., Melnyk, J.P., Tsao, R., Marcone, M.F. (2011). How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, 44, 14-22.
- Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J., Jiang, W., (2015). The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Scientia Horticulturae*, 181, 113-120.

- Wani, A.A., Singh, P., Gul, K., Wani, M.H., Langowski, H.C. (2014) Sweet cherry (*Prunus avium*): Critical factors affecting the composition and shelf life. Food Packaging and shelf life I, 86-99.
- Wargo, J. M., Padilla-Zakour, O. I., Tandon, K. S. (2003). Modified atmosphere packaging maintains sweet cherry quality after harvest. New York Fruit Quarterly, 11, 5–8.
- Watkins, C.B., Nock, J.F., Whitaker, B.D. (2000). Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. Postharvest Biology and Technology, 19, 17-32.
- Welch, C.R., Wu, Q., Simon, J.E. (2008). Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. Current Analytical Chemistry, 4, 75-101.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature, 414, 562–565.
- White, P.J., Broadley, M.R. (2003). Calcium in plants. Annals of Botany, 92, 487-511.
- Wills, R.B.H., Tirmazi, S.I.H., Scott, K. (1977). Use of calcium to delay ripening of tomatoes. HortScience, 12, 551-552.
- Wilms, L.C.; Hollman, P.C.; Boots, A.W.; Kleinjans, J.C. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. Mutation Research, 582, 155–162.
- Wrolstad, R.E., Dursta, R.W., Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. Trends in Food Science and Technology, 16, 423-428.
- Wu, X.W., Gu, L., Holden, J., Haytowiz, D.B., Gebhardt, S.E., Becher, G., Prior, R.L. (2004). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. Journal of Food Composition and Analysis, 17, 407–422.
- Yahia, E.M. (2006). Modified atmosphere for atmospheres for tropical fruits. Stewart Postharvest Review 2006, 5:6.
- Yalpani, N., Leen, J., Lawthon, M.A., Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. Plant Physiology, 103, 315-321.

- Yalpani, N., Enyedi, A.J., Leon, J., Raskin, I. (1994). Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta*, 193, 372-376.
- Yamaguchi, S., Yoshikawa, T., Ikeda, S., Ninomiya, T. (1970). Studies on the taste of some sweet substances Part I. Measurement of the relative sweetness. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34, 181-186.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35, 155-189.
- Yao, H., Tian, S., (2005). Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 253-262.
- Yin, X., Zhang, Y., Zhang, B., Yang, S-I., Shi, Y., Ferguson, I. B., Chen, K., (2013). Effects of acetylsalicylic acid on kiwifruit ethylene biosynthesis and signaling components. *Postharvest Biology and Technology*, 83, 27-33.
- Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., Serrano, M. (2008). Use of alginate or zein as edible coatings to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill) quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1287-1293.
- Zapata, P.J., Castillo, S., Valero, D., Guillén, F., Serrano, M., Díaz-Mula, H.M. (2010). The use of alginate as edible coating alone or in combination with essential oils maintained postharvest quality of tomato (Conference Paper).
- Zapata, P.J., Navarro, D., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M. (2013). Characterisation of gels from different *Aloe* spp. as antifungal treatment: Potential crops for industrial applications. *Industrial Crops and Products*, 42, 223-230.
- Zapata, P. J., Martínez-Esplá, A., Guillén, F., Díaz-Mula, H. M., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D. (2014). Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 98, 115-122.
- Zhang, X., Shen, L., Li, F., Meng, D., Sheng, J. (2011). Methyl Salicylate-Induced Arginine Catabolism Is Associated with Up-regulation of Polyamine and Nitric Oxide

- Levels and Improves Chilling Tolerance in Cherry Tomato Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9351-9357.
- Zhang, Z., Huber, D.J., Rao, J. (2013). Antioxidant systems of ripening avocado (*Persea americana* Mill.) fruit following treatment at the preclimacteric stage with aqueous 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 76, 58-64.
- Zhang, Y., Zhang, M., Yang, H. (2015). Postharvest chitosan-g-salicylic acid application alleviates chilling injury and preserves cucumber fruit quality during cold storage. *Food Chemistry*, 174, 558-563.
- Zhou, C.-H., Xu, C.-J., Sun, C.-D., Li, X., Chen, K.S. (2007). Carotenoids in white- and red-fleshed loquat fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7822-7830.
- Zhu, H.L., Zhu, B.Z., Fu, D.Q., Xie, Y.H., Hao, Y.L., Luo, Y.B. (2005). Role of ethylene in the biosynthetic pathways of aroma volatiles in ripening fruit. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52, 691-695.
- Zuzunaga, M., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Valero, D., Riquelme, F. (2001). Comparative study of two plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars during growth and ripening. *Food Science and Technology International*, 7, 123-130.

### **Páginas web consultadas:**

<http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma>. (ISO 4121-2006, 2006)

<http://faostat.fao.org>

[www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es)

[www.cerezas.org](http://www.cerezas.org)

UNIVERSITAT **Anexos**

*MH* Miguel  
Hernández







Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Scientia Horticulturae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)



## Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees improve fruit quality at harvest and during storage

M.J. Giménez<sup>a</sup>, J.M. Valverde<sup>a</sup>, D. Valero<sup>a</sup>, H.M. Díaz-Mula<sup>a</sup>, P.J. Zapata<sup>a</sup>, M. Serrano<sup>b</sup>, J. Moral<sup>c</sup>, S. Castillo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dept Food Technology, University Miguel Hernández, Orihuela, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Dept Applied Biology, University Miguel Hernández, Orihuela, Alicante, Spain

<sup>c</sup> Dept of Plant Breeding, Institute for Sustainable Agriculture (IAS-CSIC), Avd. Menéndez Pidal, S/N, 14080 Córdoba, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 July 2015

Received in revised form 13 October 2015

Accepted 19 October 2015

Available online xxx

#### Keywords:

Fruit size

Firmness

Methyl salicylate

Soluble solids

Sweet cherry

Yield

### ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of methyl salicylate (MeSA) treatments of sweet cherry trees on fruit quality properties at harvest time and during cold storage. Experiments were performed during two consecutive years by using two cultivars, 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' in 2013, and three cultivars, 'Sweet Heart', 'Sweet Late' and 'Lapins' in 2014. In the 2013 experiments, three MeSA concentrations (0.5, 1 and 2 mM) were applied at three key points of on-tree fruit development and results showed that the 1 mM concentration was the most appropriate in terms of increasing fruit size and quality parameters (improved colour, firmness and total soluble solids) at the time of harvest. Sensory analysis revealed that appearance, firmness and sweetness scores were higher in 1 mM MeSA treated cherries than in the control ones. Thus, 1 mM concentration was chosen for the 2014 experiments, in which it was found that MeSA treatments did not affect total fruit yield. The fruits from both control and 1 mM MeSA treated trees was stored at 2 °C and a relative humidity (RH) of 85% for 28 days and results showed that preharvest MeSA treatments delayed the postharvest ripening process, manifested by a lower degree in colour changes, and less loss of acidity and firmness in treated fruits with respect to controls, leading to maintenance of fruit quality. Overall, preharvest treatments with 1 mM MeSA at three key dates of sweet cherry growth and ripening improved fruit quality attributes at the time of harvest and after postharvest storage, showing that MeSA could be a safe and environmentally friendly tool with potential practical application to improve sweet cherry fruit quality.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Salicylic acid (SA) is a plant hormone with diverse regulatory roles in the metabolism of plants, such as disease resistance mechanisms and systemic acquired resistance (SAR) as well as influencing other development features such as seed germination, seedling establishments, cell growth, stomatal closure, responses to abiotic stress and fruit yield (Raskin, 1992; Vlot et al., 2009). Methyl salicylate (MeSA) is a volatile plant compound synthesized from SA having also a role in plant defence mechanisms, plant development, fruit ripening processes and plant responses against several abiotic stress factors (Hayat and Ahmad, 2007). Thus, postharvest treatment with exogenous MeSA decreased chilling injury (CI) of tomato (Fung et al., 2006), and mango (Han et al., 2006) fruits by

protecting cell wall structure and cell membranes from dysfunction caused by lipid peroxidative injury. Accordingly, in pomegranate fruits, CI was reduced by postharvest treatment with MeSA, due to maintenance of membrane structure and selective permeability. In addition, other parameters related to fruit quality, such as fruit firmness, total soluble solids (TSS) and total acidity (TA) were also maintained in MeSA treated fruits while significant losses occurred in control pomegranates (Sayyari et al., 2011).

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is a stone fruit appreciated by consumers due to excellent appearance, precocity and quality attributes, especially those related to bright red colour, firmness, sweetness and flavour (Díaz-Mula et al., 2009; Valero and Serrano, 2010; Serradilla et al., 2012). To improve sweet cherry quality parameters (such as size, colour, total soluble solids or firmness) at the time of harvest, several preharvest treatments have been carried out. Thus, gibberellic acid (alone or combined with prohexadione-Ca) applied to cherry trees at different points of fruit development led to obtaining fruit of increased mass and

\* Corresponding author. Fax: +34 96 6749677.  
E-mail address: [scastillo@umh.es](mailto:scastillo@umh.es) (S. Castillo).

size, TSS and firmness and improved resistance to pitting (Zhang and Whiting, 2011; Einhorn et al., 2013). In addition, cherry trees treated with oxalic acid (OA) at 0.5, 1.0, and 2.0 mM at 98, 112, and 126 days after full blossom (DAFB) led to fruit with higher volume, mass, colour, firmness, total anthocyanins, total phenolics, and antioxidant activity than control ones, although no significant differences were found in TSS or TA (Martínez-Esplá et al., 2014).

Preharvest treatment with SA or acetylsalicylic acid (ASA), applied by foliar spray to sweet cherry trees, increased fruit mass, colour, firmness and antioxidant activity at commercial harvest (Giménez et al., 2014). On the other hand, SA or ASA postharvest treatments of sweet cherry delayed the postharvest ripening process, manifested by a lower degree in colour changes, a lower loss of acidity and firmness, and a maintained higher content of bioactive compounds and antioxidant activity, leading to fruits with higher quality attributes as compared with control fruits (Valero et al., 2011). However, the commercial applications of postharvest treatment to preserve fruit quality is restrictive due to legal directives of the different countries and more research is needed to find preharvest treatments with effect on maintaining fruit quality attributes during storage, especially in fruits that deteriorate quickly, such as sweet cherry (Esti et al., 2002; Alique et al., 2005; Serrano et al., 2009).

As far as we know, there is no scientific literature about the possible effect of MeSA treatment, either at pre- or postharvest, on quality parameters of sweet cherry fruits. Therefore, this is the first study in which the effect of preharvest MeSA treatments on sweet cherry trees was evaluated for crop yield and fruit quality parameters at harvest time and during cold storage for long periods. In the 2013 experiment, three MeSA concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 mM) were applied to 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars and in year 2014 only the 1.0 mM concentration was chosen and applied to 'Sweet Heart', 'Sweet Late' and 'Lapins' cultivars.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The experiments were carried out in a commercial orchard "Fincas Toli S.L." of sweet cherry 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars, located in Jumilla (Murcia, Spain) during the spring-summer of 2013 and 2014. Another trial was conducted in a commercial in a commercial orchard "Cerezas Aitana" (Alicante, Spain) of sweet cherry 'Lapins' cultivar during 2014.

### 2.2. Experimental design

In the 2013 experiment, two separated rows, one for each cultivar were selected in the orchard "Fincas Toli S.L.". Twelve trees were selected in each cultivar-row according to completely randomized design with three replicated trees per treatment. The treatments evaluated were: control (distilled water) and methylsalicylate (MeSA) at 0.5, 1.0 and 2.0 mM. In the 2014, 10 trees (replicates) of each cultivar were selected completely at random for each following treatments: control (distilled water) and MeSA at 1.0 mM, since this was the dose with which the best results were previously obtained in the 2013 experiment. For both years, the first and the last two trees of each row were considered guard trees and each treated trees was separated by two un-treated trees to avoid cross-contamination. Treatments were performed by foliar spraying with freshly prepared MeSA solutions (containing 0.5% of Tween 20) by using a mechanical mist sprayer (7.5 L/tree, which was enough to wet the entire tree canopy). This procedure was repeated at 3 dates of the growth cycle, which corresponded to key events in the fruit developmental process, according to previous

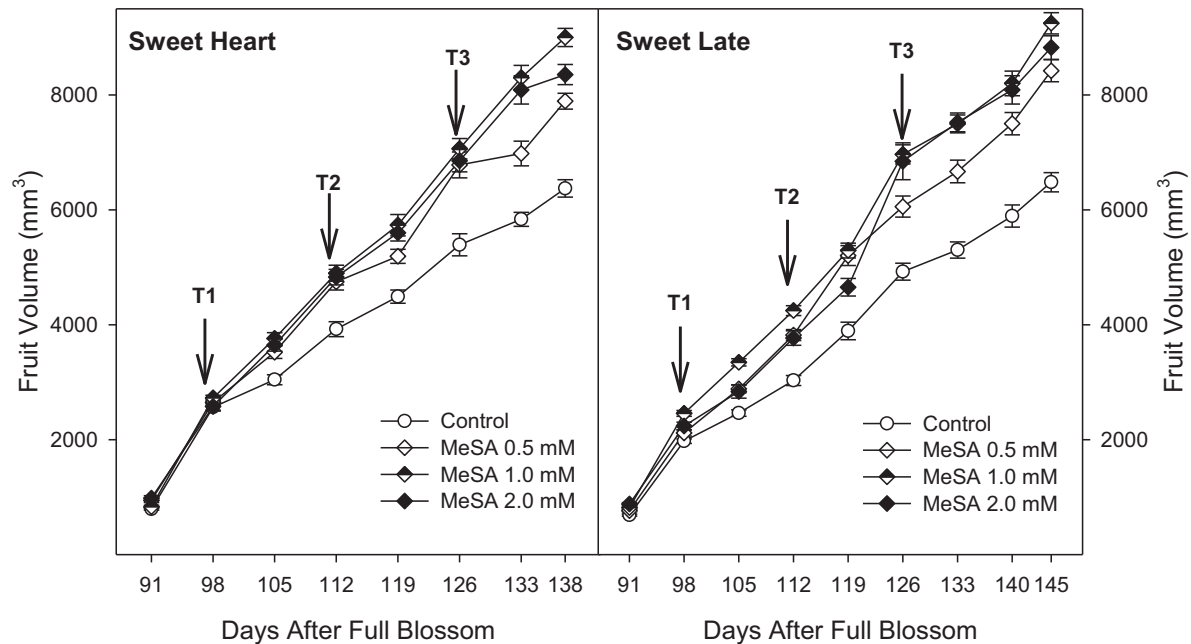
experiments: T1 (at pit hardening), T2 (initial colour changes) and T3 (onset of ripening) (Fig. 1). In the 2013 experiment, one week before the T1 treatment, 20 fruits were labelled around the equatorial perimeter of each tree, in which fruit growth was followed by measuring polar, suture and cheek diameters, and then fruit volume was calculated as previously reported (Díaz-Mula et al., 2009). On a weekly basis, from 1 week before the T1 treatment to commercial harvesting, 20 fruits (similar to those labelled previously) for each tree (or replicate) were picked for further analytical determinations: fruit mass, firmness, colour, TSS and TA. All sweet cherry fruits were harvested at commercial ripening stage, according to the Technician's company and based on visual colour using the CTIFL chart, which was 5 for 'Lapins' cultivar and 4 for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars, according to previous report (Díaz-Mula et al., 2009). In the 2013 storage experiment, 300 fruits, homogeneous in colour and size and without visual defects were selected for each cultivar from control and 1.0 mM MeSA treated trees. These 300 fruits were randomly grouped in 15 lots of 20 fruits, weighted and stored at 2 °C and RH of 85%. Three lots were taken at random after 0, 7, 14, 21 and 28 days of storage +1 day at 20 °C and RH of 70% for analytical determinations. Other lots of 100 fruits from each tree were selected from control and 1.0 mM MeSA treated trees to perform sensory analysis. In the 2014 experiment, the total fruit production, from each of the 10 treated or control trees, was recorded and yield expressed as kg per tree. From each tree, 3 lots of 100 fruits were taken at random and used to calculate fruit mass at harvest. Then 300 fruits, homogeneous in colour and size and without visual defects were selected for each cultivar from control and 1.0 mM MeSA treated trees and randomly grouped in 15 lots of 20 fruits for storage as in the 2013 experiment.

### 2.3. Fruit quality parameters

Colour was determined in each cheek of 20 fruits from each replicate by using a CR-200 chroma meter (Konica Minolta, Inc., Tokio, Japan), using the CIELab coordinates and expressed as the colour  $a^*/b^*$  index. Fruit firmness was determined independently in 20 fruits of each replicate using a TX-XT2i Texture Analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK) interfaced to a personal computer, with a flat steel plate mounted on the machine. For each fruit, the cheek diameter was measured and then a force that achieved a 3% deformation of the fruit diameter was applied. Results were expressed as the force-deformation ratio ( $N\ mm^{-1}$ ). After that, the 20 fruits of each lot or replicate were cut into small pieces to obtain a homogeneous sample for each replicate. TSS were determined in duplicate in the juice obtained from 5 g of each sample with a digital refractometer Atago PR-101 (Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 20 °C, and expressed as  $g\ 100\ g^{-1}$ . TA was determined in duplicate in the same juice by automatic titration (785 DMP Titrino, Metrohm AG, Herisau, Switzerland) with 0.1 N NaOH up to pH 8.1, using 1 mL of diluted juice in 25 mL of distilled  $H_2O$ , and results were expressed as  $g$  of malic acid equivalent  $100\ g^{-1}$  of fresh weight.

### 2.4. Sensory analysis

The sensory analysis was performed in the 2013 experiment for the control and 1.0 mM MeSA treatment. Ten panellists, previously trained with commercial samples of sweet cherries of different cultivars, were asked to perform a sensory characterisation of the studied batches. From the 100 cherries harvested at the last sampling date from each tree (or replicate), cultivar and treatment, one sample of five fruits chosen at random was presented and evaluated for each panellist. Descriptive analysis was performed according to international standard methods (ISO 4121, 2003) to evaluate



**Fig. 1.** Fruit volume ( $\text{mm}^3$ ) in 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars during on-tree fruit development as affected by methyl salicylate (MeSA) treatment at 0.5, 1.0 and 2.0 mM, in 2013 experiment. T1, T2 and T3 show the days of treatments. Data are the mean  $\pm$  SE.

appearance, skin colour, sweetness, sourness, and firmness by using a numbered scale from 1 (poor) to 5 (excellent).

### 2.5. Statistical analysis

The experiments were conducted in a completely randomised design for each cultivar, either located in Jumilla ('Sweet Heart' and 'Sweet Late') or in Alicante ('Lapins'), or year. For the fruit growth and on-tree ripening experiments, the number of replicates were 3 and 10 in years 2013 and 2014, respectively. For the storage experiments, 3 replicates were used for both years. The dependent variables (fruit colour, firmness, fruit mass,  $\text{kg tree}^{-1}$ , TSS, TA and volume) were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means were compared with the Fisher's protected Least Significant Difference (LSD) test at  $\alpha = 0.05$  or test at  $P = 0.05$ . The different experimental errors were calculated including the error between replicate trees, among fruits within the same tree, and among fruits within the same lot. In the case of the 2014 harvest data (fruit mass and  $\text{kg tree}^{-1}$ ), the effect of treatment (fruit treated vs. control fruit) was studied using a Two-Sample *T* test considering equal or unequal variances according to the Folded *F* test. Finally, the data from sensorial analysis were analysed using the non-parametric Kruskal–Wallis test and mean ranks of cultivars were compared at  $P = 0.05$  using Dunn's test. Data from all experiments were analysed using Statistix 10 (Analytical Software, Tallahassee, FL).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Fruit growth on tree and crop yield

In the 2013 experiment, it was found that cherry fruit volume increased along development on tree, although it was generally higher in those cherries treated with the three MeSA concentrations for both cultivars, which were individually studied, the effect being evident from the first application (T1). Moreover, because there was significant ( $P < 0.001$ ) effect of the interaction day  $\times$  treatment in both cultivars, we separately studied the effect of treatment on fruit volume ( $\text{mm}^3$ ) for each sampling date. Overall, the highest effect was obtained with the 1.0 mM dose, for which increases of

fruit volume of 41 and 42% were achieved for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars, respectively, at the time of harvest (Fig. 1). A similar behaviour was observed when studying fruit mass curves (data not shown) with the final fruit mass at harvest time being significantly higher in all MeSA treated fruits than in controls (Table 1). The most prominent effect was obtained with the 0.5 and 1.0 mM MeSA treatments for the 'Sweet Heart' cultivar and with the 1.0 and 2.0 mM concentrations for the 'Sweet Late' one (Table 1). Based on the results of fruit volume and mass, the 1.0 mM dose was chosen to perform the experiment in the 2014. In this year, a significant ( $P < 0.05$ ) increase of 12, 36 and 19% in mass was obtained for 1.0 mM MeSA treated 'Sweet Heart', 'Sweet Late' and 'Lapins' cultivars, respectively, with respect to controls (data not shown). However, total yield, expressed as kg of fruit per tree, was not affected ( $P > 0.05$ ) by MeSA treatment, with production about 52, 35 and 27 kg per tree, for 'Sweet Heart', 'Sweet Late' and 'Lapins' cultivars, respectively.

Results show that MeSA treatments could improve the economic performance of this crop, since although the total yield was not modified, larger cherries were obtained, which are more appreciated by consumers and reach higher prices at markets compared to small ones. Accordingly, SA and ASA treatments of sweet cherry trees and SA treatment of peach tree (applied at three dates during the growth cycle) increased fruit mass without a significant effect on the total yield (Ali et al., 2014; Giménez et al., 2014; Hendricks et al., 2015). However, MeSA applied to pepper plants at the beginning of the flowering stage, led to fruits with an increased mass at harvest time, but in this case the total yield was also enhanced due to an increase of fruit number (Elwan and El-Hamahmy, 2009). This different behaviour could be attributed to the fact that in pepper plants, continuous flowering occurs along the growth cycle, while in sweet cherry trees a single flowering stage exists and treatments started 98 DAFB. Accordingly, in olive trees, foliar spray with SA increased fruit mass, size and yield due to an increase in both flower number and density, since treatments were performed one month before flowering (El-Razek et al., 2013). Thus, it could be interesting to investigate whether MeSA treatments applied to cherry trees before flowering, combined with treatments during fruit growth,

**Table 1**  
Data at harvest time for fruit mass, total acidity (TA) and firmness of two sweet cherry cultivars treated with methyl salicylate (MeSA) during the 2013 experiment.

Cultivar	MeSA (mM)	Mass (g)	TA (g 100 g <sup>-1</sup> )	Firmness (N mm <sup>-1</sup> )
'Sweet Heart'	0	7.07 ± 0.12	1.59 ± 0.05	2.89 ± 0.09
	0.5	9.11 ± 0.30	1.53 ± 0.02	3.18 ± 0.10
	1.0	9.02 ± 0.15	1.69 ± 0.05	3.59 ± 0.08
	2.0	8.61 ± 0.07	1.72 ± 0.07	3.18 ± 0.08
'Sweet Late'	0	6.84 ± 0.17	1.35 ± 0.04	2.61 ± 0.09
	0.5	8.14 ± 0.16	1.40 ± 0.03	3.65 ± 0.12
	1.0	8.97 ± 0.20	1.48 ± 0.02	4.01 ± 0.13
	2.0	8.84 ± 0.30	1.43 ± 0.02	4.03 ± 0.13

Data are the mean ± SE.

would be able to increase the fruit number production by tree apart from the fruit size.

### 3.2. Fruit quality parameters evolution during fruit on-tree growth and ripening

In the 2013 experiment, the treatment, the DAFB, and their interaction affected ( $P < 0.05$ ) the colour index ( $a^*/b^*$ ) on both cultivars. For that, the effect of treatments was studied separately for each day. Overall, the colour index increased during development (Fig. 2), the evolution being retarded in MeSA treated cherries, from 112 to 133 DAFB and from 126 to 140 DAFB, for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively. However, at the time of harvest sweet cherries of both cultivars treated with MeSA at 1.0 mM showed a significantly ( $P < 0.05$ ) higher colour index compared to control ones, while no significant ( $P > 0.05$ ) effect was obtained for 0.5 and 2.0 mM MeSA concentrations. With respect to TSS (Fig. 3), a continuous increase throughout growth and ripening was also observed for all control and treated fruits, although the 0.5 mM MeSA concentration induced a significant delay in TSS accumulation in both cultivars. However, at the time of harvest, 'Sweet Heart' treated cherries had a significantly ( $P < 0.05$ ) higher concentration of TSS compared to controls ( $\cong 18.9$  g 100 g<sup>-1</sup>) for all the applied MeSA concentrations, the highest effect being found with the 1.0 or 2.0 mM MeSA concentration, for which TSS concentrations ca. 21 g 100 g<sup>-1</sup> were reached. Similarly, TSS in 'Sweet Late' was higher in treated than in control fruits, the 1.0 mM MeSA treated cherries having significantly the highest content of TSS ( $20.25 \pm 0.20$  g 100 g<sup>-1</sup>).

Similarly, TA increased along the growth cycle but without significant differences between control and treated cherries, and then just data at the last sampling date are provided for this quality parameter (Table 1). TA at harvest date was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in 1.0 and 2.0 mM MeSA 'Sweet Heart' treated cherries than in controls, while for 'Sweet Late' cultivar just 1.0 mM dose led to fruit with higher TA content. On the contrary, fruit firmness decreased along on-tree growth and ripening in both control and treated samples (data not shown), but at the time of harvest MeSA treatments on sweet cherry trees led to significantly higher fruit firmness for both cultivars, especially with the 1.0 mM for 'Sweet Heart' and with the 1.0 and 2.0 mM doses for 'Sweet Late' (Table 1). The increases in TSS and TA concentrations and in red colour intensity and decreases in firmness observed in 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars during on-tree ripening are in agreement with previous reports on a wide range of sweet cherry cultivars (Serrano et al., 2005; 2009; Díaz-Mula et al., 2009; Serradilla et al., 2012). At harvest, 1.0 mM MeSA treatment led to cherry fruits with a higher  $a^*/b^*$  colour index, and thus these fruits would also have higher concentration of anthocyanins than control ones, since a close association between an increased  $a^*/b^*$  colour index and accumulation of anthocyanins has been reported for a wide range of cherry cultivars (Díaz-Mula et al., 2009; Serrano et al., 2009; Ballistreri et al., 2013). However, according to the technician's company and

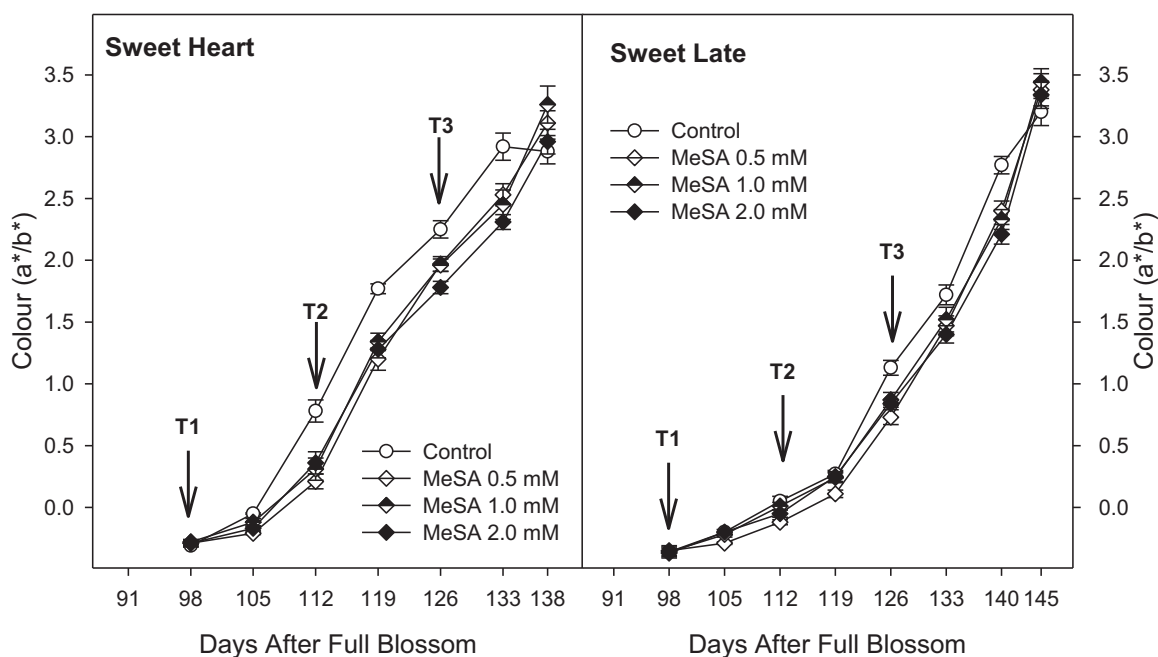
based on TSS and visual colour (using the CTIFL chart) harvest date was the same for all fruits (control and treated) although colour analytical determination with Minolta colorimeter (a more precise determination of colour parameter) revealed significant differences in colour, which is attributed to the treatments. Moreover, panellists did not find significant differences in colour between control and treated cherries (as will be commented below), in agreement with the technician's criterion. Similarly to colour, TSS and TA increased during development in control and treated fruits although at harvest the concentration of 1.0 mM MeSA led to fruits with significantly higher TSS content and TA than controls for both cultivars. It is interesting to point out that firmness levels at time of harvest were also significantly higher in cherries treated with all MeSA concentrations than in controls.

There is no available information about the effect of preharvest MeSA treatment on fruit quality parameters, although some evidences exist with its close analogue SA. For instance, preharvest treatment of oranges with SA (at 2, 4, 6 and 8 mM) increased fruit firmness and  $\beta$ -carotene and lycopene concentrations and reduced fruit rot at time of harvest (Huang et al., 2008; Ahmad et al., 2013). In table grapes, another non-climacteric fruit like sweet cherry, preharvest treatments with SA at 2 mM induced berries with higher firmness than controls at harvest time (Khalil, 2014). In these non-climacteric fruits the on-tree ripening process was not affected by SA treatments and both control and treated fruits were harvested at the same date. Accordingly, in the present experiments, no effect of the MeSA treatment on the date that cherry fruits reached their commercial ripening stage was observed, and control and treated fruits were harvested at the same date. However, in climacteric fruits such as peach preharvest application of SA (at 1, 2 and 3 mM) significantly delayed the on-tree ripening process due to the inhibition of ethylene production (Ali et al., 2014).

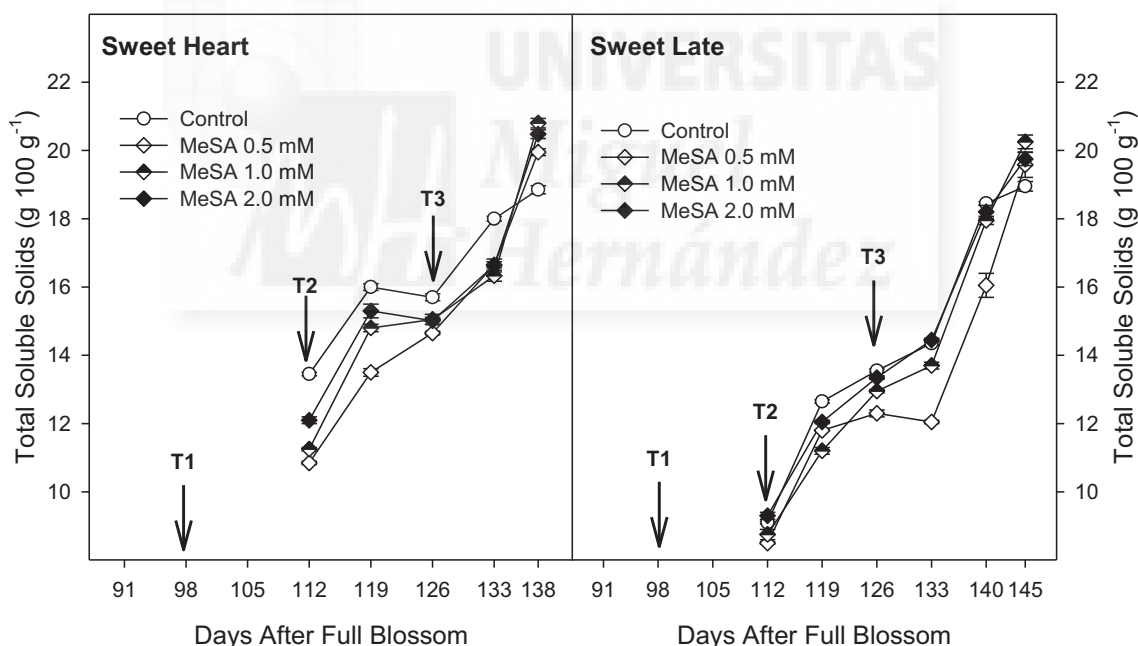
Thus, since the best results on improving cherry quality at time of harvest were obtained with the 1.0 mM dose, these fruits were then selected to analyse sensory properties at harvest time as well as the evolution of quality parameters during a prolonged cold storage period. With respect to sensory analysis, panellists gave significantly ( $P < 0.05$ ) higher scores for appearance, sweetness and firmness to cherries treated with MeSA at 1.0 mM concentration as compared with control ones (Fig. 4), while scores for sourness and colour were not significantly ( $P > 0.05$ ) different between control and treated fruits on both cultivars. These results are in agreement with those obtained for fruit size, TSS and firmness evaluated by objective instrumental analysis. In addition, no off-flavours were detected in sweet cherries from treated trees, showing that MeSA treatments had no effect on the characteristic fruit flavour.

### 3.3. Evolution of quality parameters along storage

Because there were significant interactions ( $P < 0.05$ ) between the storage time and treatment (1.0 mM MeSA treated vs. untreated) on all cultivars for the different quality parameters, we studied the effect of MeSA treatment for each sampling date. At har-



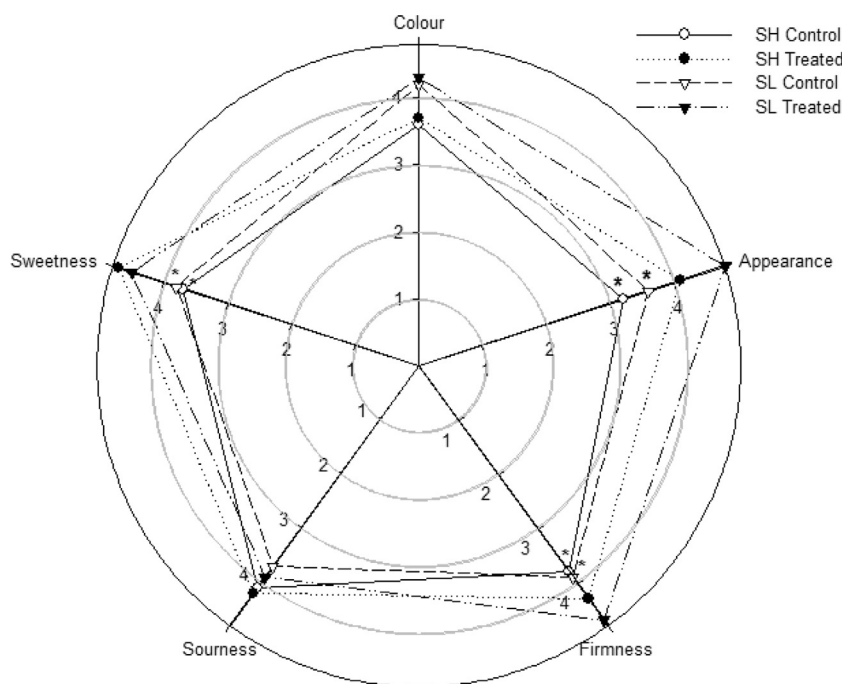
**Fig. 2.** Fruit colour index ( $a^*/b^*$ ) in 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars during on-tree fruit development as affected by methyl salicylate (MeSA) treatment at 0.5, 1.0 and 2.0 mM, in 2013 experiment. T1, T2 and T3 show the days of treatments. Data are the mean  $\pm$  SE.



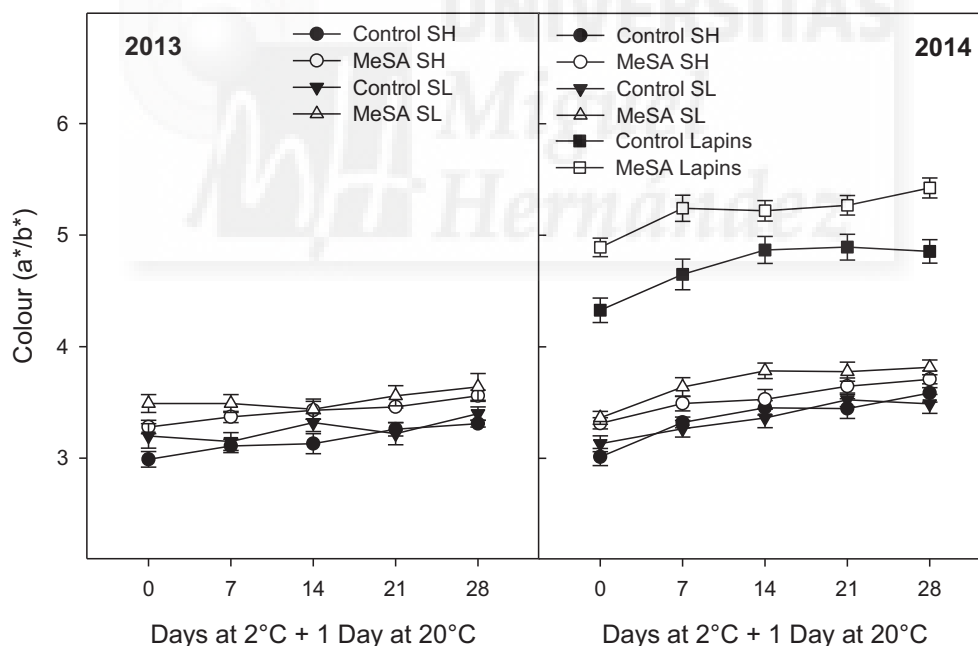
**Fig. 3.** Total soluble solids (TSS,  $g\ 100\ g^{-1}$ ) in 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars during on-tree fruit development as affected by methyl salicylate (MeSA) treatment at 0.5, 1.0 and 2.0 mM, in 2013 experiment. T1, T2 and T3 show the days of treatments. Data are the mean  $\pm$  SE.

vest, colour index ( $a^*/b^*$ ) was significantly higher in treated than in control fruits (Fig. 5) for the three cultivars and both growing seasons, the differences being maintained after 28 days of storage at  $2^\circ C + 1$  day at  $20^\circ C$ . In addition, the colour index of control and treated fruits increased from day 0 until the end of storage. Similarly, the content of TSS was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in treated than in control fruits at harvest time for all cultivars and both growing seasons and generally, these differences were maintained until the end of storage (Fig. 6). During storage, TSS generally increased in the control and treated 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars for both the 2013 and the 2014 experiments, while no changes

were detected for 'Lapins' cultivar. On the contrary, TA significantly ( $P < 0.05$ ) decreased in control and treated fruits for all cultivars and growing seasons during postharvest storage (Fig. 7), although acidity values were always higher in treated than in control cherries. On the other hand, fruit firmness also diminished throughout storage time for control and treated fruits, cultivars and growing seasons (Fig. 8). In addition, was always significantly ( $P < 0.05$ ) higher in treated than in control cherries. Thus, MeSA treatment significantly retarded fruit softening leading to firmer cherries at the end of storage. Taking into account results of TA and firmness losses it could be inferred that the evolution of the postharvest ripening process



**Fig. 4.** Results from sensory analysis performed at harvest, in 2013 experiments, in ‘Sweet Heart’ (SH) and ‘Sweet Late’ (SL) fruits from control or 1.0 mM methyl salicylate (MeSA) treated trees. Scores for quality attributes ranked from 0 (poor) to 5 (excellent). Data are the mean ± SE.



**Fig. 5.** Evolution of fruit colour ( $a^*/b^*$ ) during storage for control and 1.0 mM methyl salicylate (MeSA) treated ‘Sweet Heart’ (SH), ‘Sweet Late’ (SL) and ‘Lapins’ sweet cherries, in 2013 and 2014 experiments. Data are the mean ± SE.

was delayed in MeSA treated cherries by 1–2 weeks with respect to control ones.

Postharvest storage of sweet cherries was accompanied by a significant increase in colour and TSS and a decrease in firmness and acidity, in agreement with previous reports in other sweet cherry cultivars (Serrano et al., 2009), although for TSS evolution important differences exist depending on cultivar and ripening stage at harvest. Thus, TSS slightly diminished in ‘Ambrunes’ (Alique et al., 2005), ‘Sciazza’, and ‘Ferrovia’ (Esti et al., 2002), remained unchanged in ‘Van’ (Bernalte et al., 2003), and increased in ‘Burlat’

(Remón et al., 2003) and in a wide range of cherry cultivars (Serrano et al., 2009). MeSA treatment to cherry trees had significant effects on quality parameters, since higher colour, TSS, TA and firmness were observed in treated cherries compared to controls at the time of harvest, and maintained higher during the storage period also. Thus, since these parameters are the most important quality attributes of sweet cherry and related with the flavour of freshly harvested fruit (Esti et al., 2002; Bernalte et al., 2003; Serrano et al., 2009) it can be inferred that MeSA treatment was effective on main-

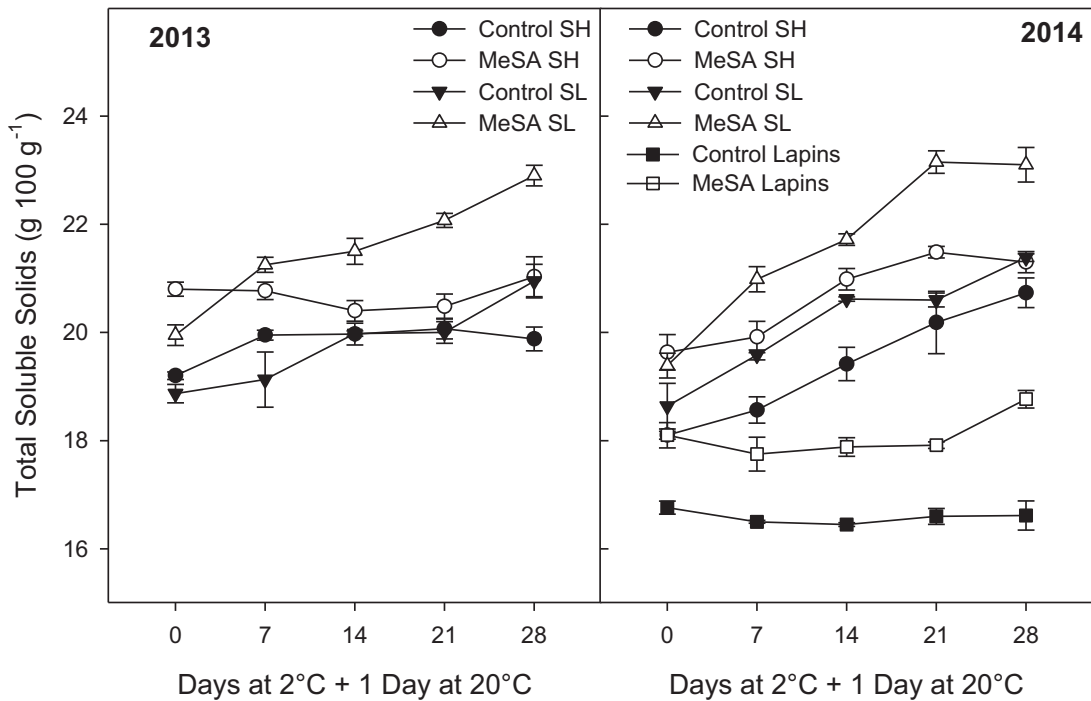


Fig. 6. Evolution of total soluble solids (TSS, g 100 g<sup>-1</sup>) during storage for control and 1.0 mM methyl salicylate (MeSA) treated 'Sweet Heart' (SH), 'Sweet Late' (SL) and 'Lapins' sweet cherries, in 2013 and 2014 experiments. Data are the mean ± SE.

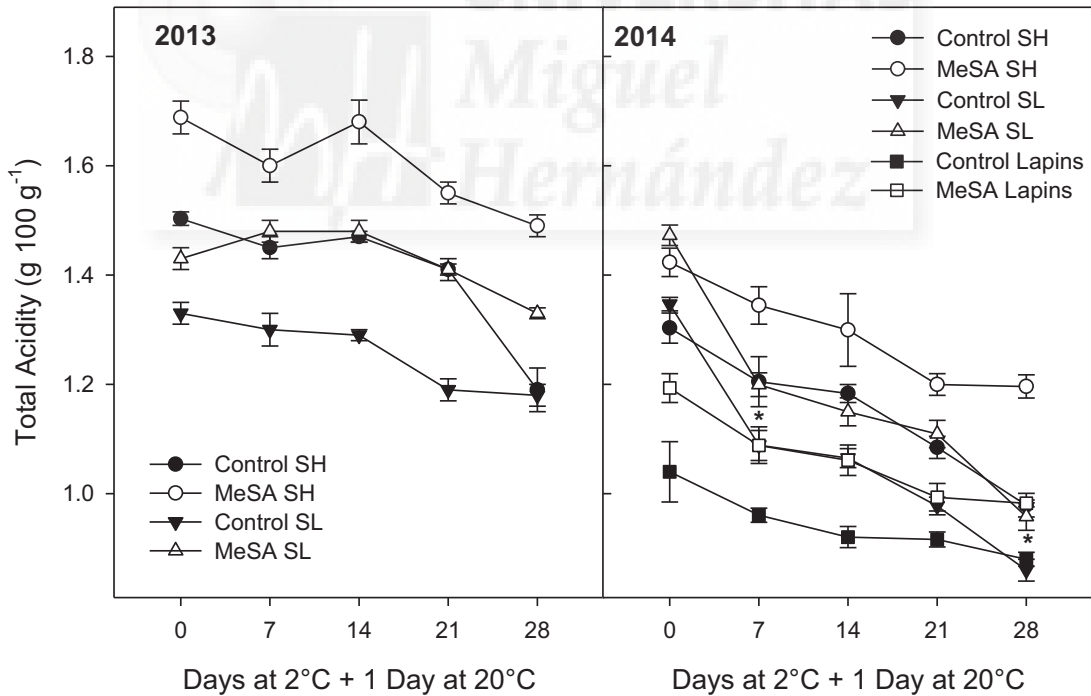
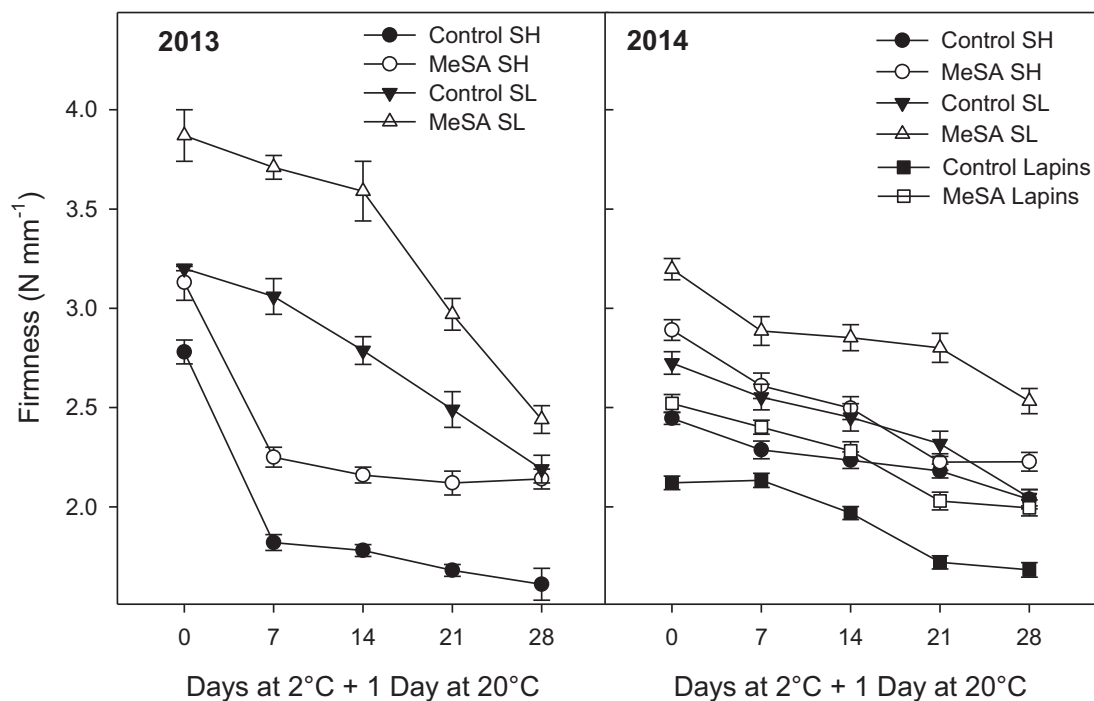


Fig. 7. Evolution of total acidity (TA, g 100 g<sup>-1</sup>) during storage for control and 1.0 mM methyl salicylate (MeSA) treated 'Sweet Heart' (SH), 'Sweet Late' (SL) and 'Lapins' sweet cherries, in 2013 and 2014 experiments. Data are the mean ± SE.

taining cherry quality properties demanded by consumers by more than one week as compared to control cherries.

No literature exists about the effect of preharvest MeSA treatment on fruit quality evolution during storage for comparative purposes, and little information exists about the effect of postharvest MeSA treatment. Thus, in sensitive fruit to CI, such as pomegranate (Sayyari et al., 2011) and mango (Han et al., 2006),

postharvest MeSA alleviated CI symptoms and reduced softening. In the case of pomegranate, MeSA also led to higher concentrations in antioxidant compounds (total phenolics and anthocyanins) and antioxidant capacity (Sayyari et al., 2011). In tomato fruits, the effect of postharvest MeSA treatments was depending on the ripening stage, since at turning stage retarded the ripening process, while acceleration was observed at mature green stage (Ding and Wang,



**Fig. 8.** Evolution of fruit firmness ( $\text{N mm}^{-1}$ ) during storage for control and 1.0 mM methyl salicylate (MeSA) treated 'Sweet Heart' (SH), 'Sweet Late' (SL) and 'Lapins' sweet cherries, in 2013 and 2014 experiments. Data are the mean  $\pm$  SE.

2003). By other hand, preharvest treatment of orange trees with SA at 8 mM maintained higher TA and firmness in orange fruits during storage (Ahmad et al., 2013). In table grape, preharvest treatment with SA at 2 mM maintained higher firmness and delayed berry ripening during 15 or 30 days of storage. Moreover, the combination of preharvest and postharvest SA was more effective in maintaining table grape quality than pre- or post-harvest treatment alone, since berries had improved firmness, lower mass loss and better appearance of both berries and rachis after long storage time (Khalil, 2014). Postharvest SA treatment also maintained higher firmness in sugar apple (Mo et al., 2008) and peach (Wang et al., 2006) during cold storage. Specifically in sweet cherry, postharvest treatments with SA or ASA delayed the loss of firmness and acidity in two cultivars ('Cristalina' and 'Prime Giant') with a net increase of the shelf life period (Valero et al., 2011). The mechanism by which MeSA delays the postharvest ripening process in sweet cherries is still unknown, although it could be related to a delay in the postharvest ripening process due to an increase of the endogenous levels of SA induced by the MeSA treatment. In this sense, the ripening process in kiwifruit correlated with a decrease in endogenous SA levels, and the application of ASA increased endogenous levels of SA and delayed changes associated with ripening and senescence such as softening, lipoxygenase activity and associated superoxide free radical production (Zhang et al., 2003). Moreover, in sweet cherry it has been found that the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) was higher in fruit treated with MeSA than in controls (Valverde et al., 2015), which could be responsible for the delay in senescence process observed in cherries from MeSA treated trees. On the other hand, both preharvest and postharvest application of SA induced sweet cherry resistance to postharvest decay caused by *Monilinia fructicola* (Yao and Tian, 2005) and *Penicillium expansum* (Xu and Tian, 2008). In our case, no symptoms of decay were observed in control or treated fruits throughout the storage period, neither in the 2013 nor in the 2014 experiments and then, the possible effect of MeSA treatment on inducing fruit resistance to microbial decay could not be evaluated.

#### 4. Conclusion

In conclusion, an improvement of cherry fruit quality by MeSA tree treatments was obtained at harvest, since the parameters related to the consumer's acceptance of sweet cherry (mainly size, colour, firmness and TSS content) were enhanced. In addition, the postharvest ripening process was delayed in fruits from treated trees and important quality parameters, such as TA and firmness were maintained at higher levels in treated fruits during postharvest storage. Thus, taking into account that MeSA is a naturally occurring substance considered as GRAS (generally recognised as safe), preharvest treatments with 1.0 mM MeSA at key dates of sweet cherry developmental stages could be considered as a safe and environmentally friendly tool to improve fruit quality at time of harvest and during storage. In the future, the impact of these treatments on bioactive compounds and antioxidant activity deserves further research studies.

#### Conflict of interest

Authors declare that they have no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

This work has been co-funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and the European Commission with FEDER Funds through Project AGL2012-35402/ALI. Juan Moral holds a "Juan de la Cierva" Post-Doc fellowship from the MEC. Authors would like to express their gratitude for the valuable help of "Fincas Toli S.L." for providing the sweet cherry fruits and technical support during the 2013 experiments, as well as "Cerezas Aitana" during the 2014 experiments. The critical reading of the manuscript by Oliver Pérez Howell MSc and English correction is deeply appreciated.



## References

- Ahmad, S., Singh, Z., Iqbal, Z., 2013. Effect of preharvest sprays of salicylic acid on the shelf life and quality of 'Lane Late' sweet orange (*Citrus sinensis* L.) cold storage. *Acta Hort.* 1012, 103–112.
- Ali, I., Abbasi, N.A., Hafiz, I.A., 2014. Physiological response and quality attributes of peach fruit cv. Florida King as affected by different treatments of calcium chloride, putrescine and salicylic acid. *Pak. J. Agric. Sci.* 51, 33–39.
- Alique, R., Zamorano, J.P., Martínez, M.A., Alonso, J., 2005. Effect of heat and cold treatments on respiratory metabolism and shelflife of sweet cherry: type picota cv Ambrunés. *Postharvest Biol. Technol.* 35, 153–165.
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., Rapisarda, P., 2013. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem.* 140, 630–638.
- Bernalte, M.J., Sabio, E., Hernández, M.T., Gervasini, C., 2003. Influence of storage delay on quality of 'Van' sweet cherry. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 303–312.
- Díaz-Mula, H.M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Serrano, M., 2009. Organoleptic, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Sci. Technol. Int.* 15, 535–543.
- Ding, C.-K., Wang, C.Y., 2003. The dual effects of methyl salicylate on ripening and expression of ethylene biosynthetic genes in tomato fruit. *Plant Sci.* 164, 589–596.
- Einhorn, T.C., Wang, Y., Turner, J., 2013. Sweet cherry fruit firmness and postharvest quality of late-maturing cultivars are improved with low-rate, single applications of gibberellic acid. *HortSci.* 48, 1010–1017.
- El-Razek, E.A., Hassan, H.S.A., El-Din, K.M.G., 2013. Effect of foliar application with salicylic acid, benzyladenine and gibberellic acid on flowering: yield and fruit quality of olive trees (*Olea europaea* L.). *Middle-East. J. Sci. Res.* 14, 1401–1406.
- Elwan, M.W.M., El-Hamamy, M.A.M., 2009. Improved productivity and quality associated with salicylic acid application in greenhouse pepper. *Sci. Hortic.* 112, 521–526.
- Esti, M., Cinquante, L., Sinesio, F., Moneta, E., Matteo, M., 2002. Physicochemical and sensory fruit characteristic of two sweet cherry cultivars after cold storage. *Food Chem.* 76, 399–405.
- Fung, R.W.M., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tao, Y., Tian, M., 2006. Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 163, 1049–1060.
- Giménez, M.J., Valverde, J.M., Valero, D., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Castillo, S., 2014. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chem.* 160, 226–232.
- Han, J., Tian, S.P., Meng, X.H., Ding, Z.H., 2006. Response of physiologic metabolism and cell structures in mango fruits to exogenous methyl salicylate under low temperature stress. *Physiol. Plant* 128, 125–133.
- Hayat, S., Ahmad, A., 2007. *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Springer, Dordrecht.
- Hendricks, D., Hoffman, E., Lötze, E., 2015. Improving fruit quality and tree health of *Prunus persica* cv: 'Sandvliet' through combined mineral and salicylic acid foliar applications. *Sci. Hortic.* 187, 65–71.
- Huang, R., Xia, R., Lu, Y., Hu, L., Xu, Y., 2008. Effect of preharvest salicylic acid spray treatment on post-harvest antioxidant in the pulp and peel of 'Cara cara' navel oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Sci. Food Agric.* 88, 229–236.
- ISO 4121:2003. Sensory analysis—Guidelines for the use of quantitative response scales.
- Khalil, H.A., 2014. Effects of pre- and postharvest salicylic acid application on quality and shelf life of 'Flame Seedless' grapes. *Eur. J. Hortic. Sci.* 79, S8–15.
- Martínez-Esplá, A., Zapata, P.J., Valero, D., García-Viguera, C., Castillo, S., Serrano, M., 2014. Preharvest application of oxalic acid increased fruit size, bioactive compounds, and antioxidant capacity in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* 62, 3432–3437.
- Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R., Xie, J., Li, W., 2008. Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 88, 2693–2699.
- Raskin, I., 1992. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.* 99, 799–803.
- Remón, S., Venturini, M.E., López-Buesa, P., Oria, R., 2003. Burlat cherry quality after long range transport: optimisation of packaging conditions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4, 425–434.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., 2011. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chem.* 124, 964–970.
- Serradilla, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., López-Corrales, M., Córdoba, M.D.G., 2012. Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain). *Food Chem.* 133, 1551–1559.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2741–2745.
- Serrano, M., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D., 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3240–3246.
- Valero, D., Serrano, M., 2010. *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*. CRC-Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
- Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., 2011. Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5483–5489.
- Valverde, J.M., Giménez, M.J., Guillén, F., Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M., 2015. Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees increase antioxidant systems in fruit at harvest and during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 109, 106–113.
- Vlot, A.C., Dempsey, M.A., Klessig, D.F., 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 47, 177–206.
- Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S., Archbold, D.D., 2006. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 41, 244–251.
- Xu, X., Tian, S., 2008. Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 379–385.
- Yao, H., Tian, S., 2005. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 35, 253–262.
- Zhang, C., Whiting, M., 2011. Pre-harvest foliar application of prohexadione-Ca and gibberellins modify canopy source-sink relations and improve quality and shelf-life of 'Bing' sweet cherry. *Plant Growth Regul.* 65, 145–156.
- Zhang, Y., Chen, K., Zhang, S., Ferguson, I., 2003. The role of salicylic acid in postharvest ripening of kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 67–74.



# Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees increase antioxidant systems in fruit at harvest and during storage



Juan Miguel Valverde<sup>a</sup>, M. José Giménez<sup>a</sup>, Fabián Guillén<sup>a</sup>, Daniel Valero<sup>a</sup>, Domingo Martínez-Romero<sup>a</sup>, María Serrano<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department Food Technology, University Miguel Hernández, Orihuela, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Department Applied Biology, University Miguel Hernández, Orihuela, Alicante, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 12 March 2015

Received in revised form 17 June 2015

Accepted 21 June 2015

Available online 2 July 2015

### Keywords:

Anthocyanins

Ascorbate peroxidase

Catalase

Peroxidase

Phenolics

Postharvest senescence

Superoxide dismutase

## ABSTRACT

Sweet cherry trees (*Prunus avium* L.) were treated with methyl salicylate (MeSa) at 1 mM at 3 key events on fruit development on-tree to analyze the effect of MeSa on bioactive compounds, total antioxidant activity (TAA) and antioxidant enzymes at harvest and during 28 days storage. The experiments were performed during two consecutive years, by using two sweet cherry cultivars, 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' in 2013 and another more cultivar, 'Lapins', in 2014. Both total phenolics and anthocyanins content were significantly higher in MeSa-treated than in control fruit at harvest and during storage, leading to fruit with higher hydrophilic TAA (H-TAA). The activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) decreased along storage for all cultivars and experimental years, although those fruit treated with MeSa exhibited higher activities of these antioxidant enzymes than controls. Thus, MeSa treatment of cherry trees could increase health-promoting properties of cherry fruit consumption, due to its effect on increasing antioxidant and bioactive compounds, with additional effect on delaying the fruit postharvest senescence process by increasing the activity of the enzymes involved in reactive oxygen species (ROS) scavenging.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Methyl salicylate (MeSa) is a volatile plant compound synthesized from salicylic acid having a role in plant growth and development, plant defense-mechanism, plant responses against several abiotic stresses as well as in the fruit ripening process (Hayat and Ahmad, 2007; Kumar, 2014). Thus, postharvest treatment with exogenous MeSa decreased chilling injury (CI) of tomato (Fung et al., 2006), sweet pepper (Fung et al., 2004) and mango (Han et al., 2006) fruits by protecting cell wall structure and cell membranes from dysfunction caused by lipid peroxidative injury. Accordingly, in pomegranate fruit, postharvest treatment with MeSa reduced significantly the CI symptoms, by maintaining membrane structure and its selective permeability leading to lower values of electrolyte leakage. In addition, other parameters related to fruit quality, such as fruit firmness, total soluble solids and total acidity were also maintained in MeSa treated fruit while significant losses occurred in control pomegranates (Sayyari et al., 2011a). Moreover, the content of total phenolics and total

anthocyanins as well as the antioxidant activity in the arils increased along storage, although these increases were significantly higher in MeSa-treated than in control pomegranates, showing that MeSa has potential postharvest applications for reducing CI, maintaining quality, and improving the health benefits of pomegranate fruit consumption by increasing its antioxidant capacity and bioactive compounds (Sayyari et al., 2011a; Valero et al., 2015).

Reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroxide radical ( $O_2^{\bullet 2-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $OH^{\bullet-}$ ), are inevitably generated in plant cells as a consequence of normal metabolism, mainly in reactions catalyzed by oxidase and lipoxygenase and in  $\beta$ -oxidation of fatty acids. The ROS content in plant cell is dependent on their producing systems and scavenging mechanism, both enzymatic and non-enzymatic ones (Apel and Hirt, 2004). Non-enzymatic antioxidant compounds are reduced forms of ascorbate and glutathione, tocopherols, phenolics, alkaloids and carotenoids, while enzymatic scavenging mechanisms include mainly superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX). SOD detoxifies  $O_2^{\bullet-}$  free radicals by converting them to  $O_2$  and  $H_2O_2$ , which is further converted to  $H_2O$  and  $O_2$  by CAT, APX and POD. CAT catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to

\* Corresponding author. Fax: +34 96 6749678.

E-mail address: [m.serrano@umh.es](mailto:m.serrano@umh.es) (M. Serrano).

water and oxygen, while APX uses ascorbate and  $H_2O_2$  as substrates producing water and dehydroascorbate as products, the last one being converted to ascorbate by glutathione reductase enzyme. In addition,  $H_2O_2$  can be also reduced to water by POD, by using organic molecules such as phenols as electron donor (Tareen et al., 2012). However, in spite of the presence of these efficient antioxidant systems, oxidative damages still occur in plant cells either due to uncontrolled production or inefficient scavenging of ROS. Thus, since the overall process of fruit ripening is considered as a functionally modified protracted form of senescence, associated with ROS accumulation (Hodges et al., 2004), the presence of high content of antioxidant compounds and high activity of antioxidant enzymes could lead to a delay of the fruit postharvest ripening process and to maintain fruit quality attributes for longer periods (Mondal et al., 2009; Kumar et al., 2014).

In this sense, in fruits such as mango and sugar apple, it has been shown that postharvest salicylic acid (SA) treatments led to lower superoxide free radical production and lipoxygenase activity and increases in the activity of SOD, CAT, and APX antioxidant enzymes during storage as compared with control fruit (Ding et al., 2007; Mo et al., 2008). Similar increases in these antioxidant enzymes were observed in peach fruit after postharvest SA treatment (Tareen et al., 2012). Even in sweet cherry, treatments with SA three days before harvesting or after harvesting increased POD activity and its transcript levels, which was related to the reduced fungal infection found in SA-treated fruit, especially when SA was applied to fruit at earlier maturity stages (Yao and Tian, 2005; Chan et al., 2008).

In previous reports, we have found that postharvest treatments of sweet cherry with SA or acetylsalicylic acid (ASA), which are close analogues of MeSa, delayed the postharvest ripening process, manifested by lower color changes and acidity and firmness losses, and maintained higher content of bioactive compounds and antioxidant activity during storage as compared with control fruit (Valero et al., 2011). Moreover, treatments of sweet cherry trees with SA or ASA, by foliar spray, during on-tree cherry growth and ripening, increased fruit weight and quality attributes (such as color and firmness) at commercial harvest, as well as the concentration of total phenolics and anthocyanins, which led to fruits with higher antioxidant activity, in both hydrophilic and lipophilic fractions (Giménez et al., 2014). By other hand, similar MeSa treatments of sweet cherry trees also increased fruit size and quality properties, such as firmness and TSS, at time of harvesting, showing also a significant effect on maintaining sweet cherry organoleptic properties along storage (Giménez et al., unpublished data). However, as far as we know, there is no scientific literature about the possible effect of MeSa treatment, either at pre- or postharvest application, on sweet cherry antioxidant systems. Then, the aim of this research was to evaluate for the first time the effect of preharvest MeSa treatments of sweet cherry trees on antioxidant compounds and the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, POD and APX, at harvest and during prolonged cold storage. To achieve these objectives, the experiments were performed in two consecutive years, 2013 and 2014, by using two and three cherry cultivars, respectively.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and experimental design

The experiments were performed in two consecutive years, 2013 and 2014 spring–summer periods. In 2013, two sweet cherry cultivars, ‘Sweet Heart’ and ‘Sweet Late’, cultivated in a commercial plot from “Fincas Toli S.L.” located at Jumilla (38.473800N, –1.323861W, Murcia, Spain) were used and in 2014 another

cultivar, ‘Lapins’, cultivated in a commercial plot for “Cerezas Aitana” located at Alcoy (38.780634N, –0.443124W, Alicante, Spain) was also used. Both locations are close each other with similar environmental and climatic conditions, and cherry trees grown under similar cultural practices. All cultivars are grafted on the ‘Santa Lucía 64’ rootstock and planted at  $3 \times 4$  m. Three trees were selected completely at random for each cultivar and treatment: control (distilled water), and MeSa at 1.0 mM. This MeSa concentration was shown as appropriate in terms of increased fruit quality attributes (Giménez et al., unpublished data). Freshly prepared solutions (containing 0.5% of Tween 20) were foliar sprayed with a mechanical mist sprayer (7.5 L/tree) and repeated at three dates of the growth cycle, which corresponded to key events in fruit developmental process, according to previous experiments (Díaz-Mula et al., 2009; Giménez et al., 2014): T1 (at pit hardening), T2 (initial color changes) and T3 (onset of ripening). Sweet cherry fruit were harvested at commercial ripening stage which corresponded to S2 stage according to Serrano et al. (2009), and immediately transferred to the laboratory. Then, 90 fruits, homogeneous in color and size and without visual defects were selected from each tree or replicate, cultivar, year and treatment and randomly grouped in 3 lots of 30 fruits, which were stored in a cold room at normal atmosphere at  $2^\circ\text{C}$  and RH of 85%. One lot was taken at random from each replicate after 0, 14 and 28 days of cold storage and transferred for 1 day at  $20^\circ\text{C}$  and RH of 70%, afterward the analytical determinations were performed. The edible portion of the fruit from each lot was cut in small pieces to obtain a homogeneous sample, frozen in liquid  $N_2$ , mixed and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until total anthocyanins, total phenolics, antioxidant activity, in both hydrophilic and lipophilic fractions and SOD, CAT, POD and APX activities were determined in duplicate for each sample.

### 2.2. Total phenolics, total anthocyanins, total carotenoids and total antioxidant activity determination

Phenolic extraction was performed by using 2 g of frozen tissue and 10 mL of water:methanol (2:8) containing 2 mM NaF (to inactivate polyphenol oxidase activity and prevent phenolic degradation) as previously described (Serrano et al., 2009) and quantified using the Folin–Ciocalteu reagent and results (mean  $\pm$  SE) were expressed as mg gallic acid equivalent  $100\text{g}^{-1}$  fresh weight (FW). Total anthocyanins were extracted and determined according to previously reported (Serrano et al., 2005) and calculated as cyanidin 3-glucoside equivalent (molar absorption coefficient of  $23,900\text{Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$  and molecular weight of  $449.2\text{g mol}^{-1}$ ) and results (mean  $\pm$  SE) expressed as mg  $100\text{g}^{-1}$  FW. Total carotenoids were extracted according to Valero et al. (2011). Briefly, 2 g of sweet cherry fruit were extracted with acetone and shaken with diethyl ether and 10% NaCl for separation of the two phases. The lipophilic phase was washed with  $Na_2SO_4$  (2%), saponified with 10% KOH in methanol, and the pigments were subsequently extracted with diethyl ether, evaporated and then made up to 25 ml with acetone. Total carotenoids were estimated by reading the absorbance at 450 nm and expressed as mg of  $\beta$ -carotene equivalent  $100^{-1}$  FW, taking into account the  $\epsilon^{1\%}\text{cm} = 2,560$  and results were the  $\pm$ SE.

TAA was quantified as previously described (Serrano et al., 2009) by homogenizing 2 g of tissue in 10 mL of 50 mM Na-phosphate buffer at pH 7.8 and 3 mL of ethyl acetate. After centrifugation at 10,000 g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ , the upper fraction was used to quantify total antioxidant activity due to lipophilic compounds (L-TAA) and the lower for total antioxidant activity due to hydrophilic compounds (H-TAA), in a reaction medium containing 50  $\mu\text{L}$  of the extract, 2 mM of the chromophore 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium

salt, 15  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , and 25  $\mu\text{M}$  horse radish peroxidase enzyme in 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.8) or methanol, for H-TAA and L-TAA, respectively, in a total volume of 1 mL. A calibration curve was performed with Trolox ((R)-(+)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methyl-croman-2-carboxylic acid) (0–20 nmol) from Sigma (Madrid, Spain), and the results (mean  $\pm$  SE) are expressed as mg of Trolox equivalent  $100\text{g}^{-1}$  FW.

### 2.3. Antioxidant enzymes

Crude extract for SOD, CAT, APX and POD enzymes was performed by homogenizing 5 g of frozen samples with 10 mL of phosphate buffer 50 mM, pH=7.0 containing 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The homogenate was centrifuged at  $15,000 \times g$  for 30 min at  $4^\circ\text{C}$  and the supernatant used for enzyme assay. POD was determined as previously reported (Zapata et al., 2014), in a reaction mixture containing 50 mM phosphate buffer pH=7.0, 12 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 14 mM guaiacol and 100  $\mu\text{L}$  of enzymatic extract in a total volume of 3 mL. The increase of absorbance at 470 nm, due to guaiacol oxidation, was measured for 1 min. One enzymatic unit (U) was defined as 0.01 absorbance increase per minute, and peroxidase activity expressed as  $\text{U min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ . For CAT and APX activities, the protocol described by Zhang et al. (2013) was used. In brief, for CAT, 100  $\mu\text{L}$  of the above extract were added to 2.9 mL of reaction mixture containing 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 50 mM phosphate buffer pH=7.0. The degradation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was measured by the decrease of absorbance at 240 nm during 1 min. One enzymatic unit (U) was defined as 0.01 absorbance decrease per minute, and CAT activity expressed as  $\text{U min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ . For APX quantification the assay mixture contained 50 mM potassium phosphate pH=7.0, 0.5 mM ascorbic acid and 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The decrease of absorbance at 290 nm during 1 min was measured. One enzymatic unit (U) was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1  $\mu\text{mol}$  of ascorbate per minute, and APX activity expressed as  $\text{U min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ . SOD activity was determined photochemically as described in

Zhang et al. (2013) with slight modifications. The reaction solution contained 50 mM phosphate buffer, pH 7.8, 5 mM methionine, 100  $\mu\text{M}$  EDTA and 65  $\mu\text{M}$  nitro-blue-tetrazolium (NBT). To 2.9 mL of this solution were added 25  $\mu\text{L}$  of enzyme extract and 40  $\mu\text{L}$  of 0.15 mM riboflavin. The tubes were then placed in a fluorescent light incubator (40 W, 10 min) and the formation of blue formazan was monitored by recording the absorbance at 560 nm. One unit (U) of SOD activity is defined as the amount of enzyme that causes a 50% inhibition of NBT reduction under assay conditions. The results are reported as  $\text{U mg protein}^{-1}$ . For all antioxidant enzyme activities results are the mean  $\pm$  SE. Total protein content in the enzyme extract was quantified according to Bradford (1976).

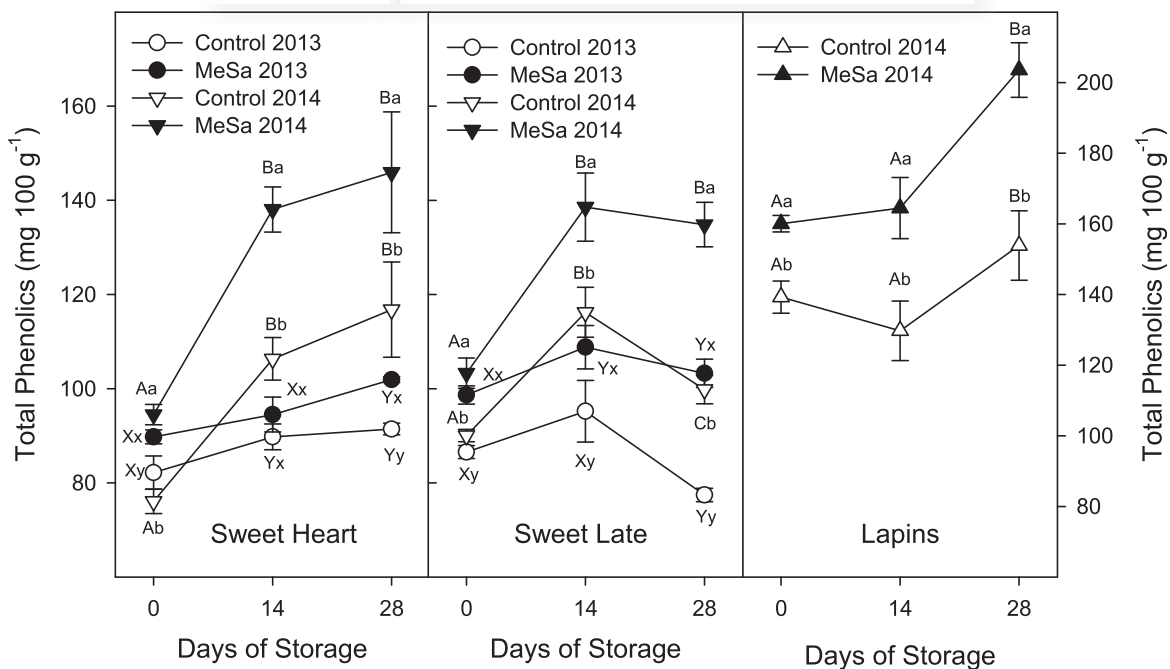
### 2.4. Statistical analysis

The experiments were carried out by using a completely randomized design. Experimental data from each cultivar and year were independently subjected to ANOVA. Sources of variation for each cultivar and year were treatment and storage time. Mean comparisons were performed using HSD the Duncan's multiple test to examine if differences were significant at  $p < 0.05$ . All analyses were performed with SPSS software package v. 22.0 for Windows (SPSS, 2011). Correlations were performed between H-TAA and total anthocyanins or total phenolics and between L-TAA and carotenoids concentration.

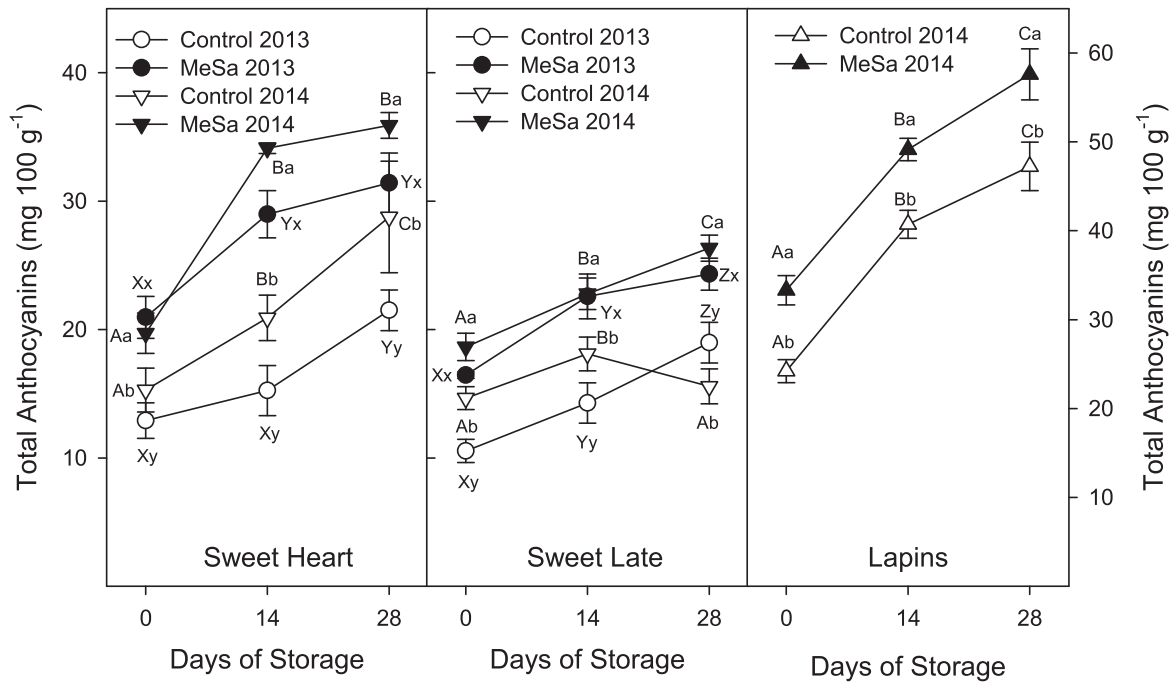
## 3. Results and discussion

### 3.1. Phenolics, anthocyanins and antioxidant activity

It has been reported that total phenolic concentration in sweet cherry fruit increases during the last weeks of fruit development on tree, reaching final values ranging from 80 to  $200\text{ mg }100\text{g}^{-1}$ , depending on cultivar, ripening stage, agronomic practices and environmental conditions (Serrano et al., 2005; Usenik et al., 2008; Diaz-Mula et al., 2009; Ballistreri et al., 2013). As it is shown in Fig. 1,



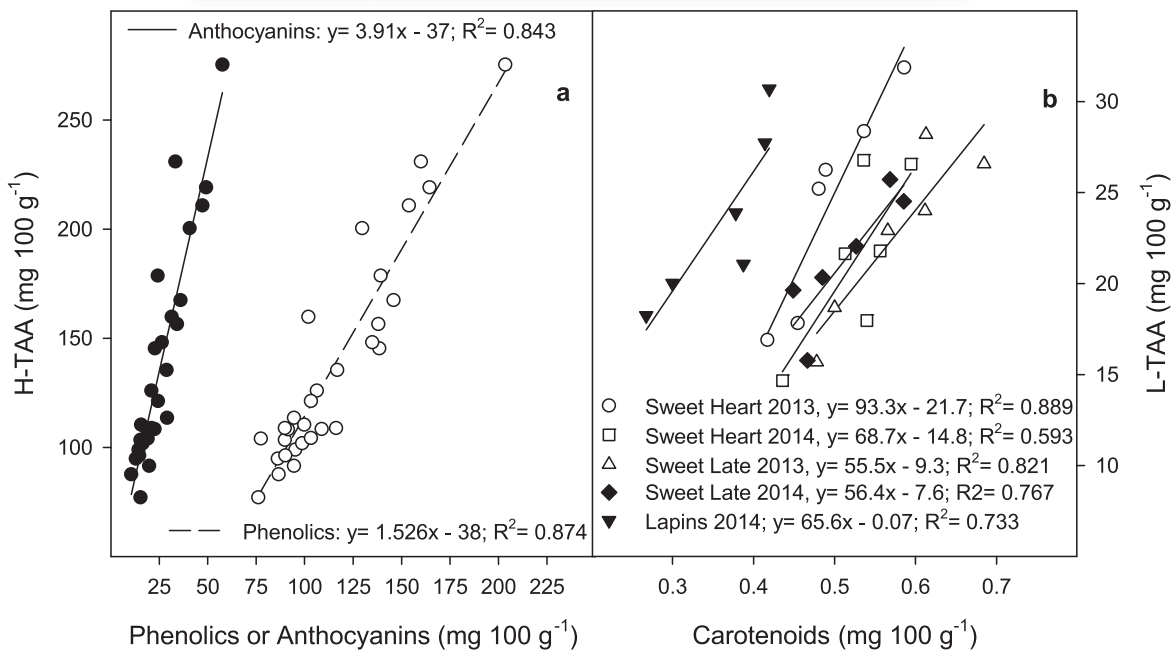
**Fig. 1.** Total phenolic concentration in control and methyl salicylate (MeSa) treated 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars, for 2013 and 2014 year experiments (left scale), and in 'Lapins' cultivar for 2014 experiment (right scale), during storage at  $2^\circ\text{C} + 1$  day at  $20^\circ\text{C}$ . Data are the mean  $\pm$  SE. Different lower case letters show significant differences between control and treated fruit for each sampling date in 2013 (x, y) and in 2014 (a, b), while capital letters show significant differences along storage time in 2013 (X, Y) and in 2014 (A, B, C).



**Fig. 2.** Total anthocyanin concentration in control and methyl salicylate (MeSa) treated ‘Sweet Heart’ and ‘Sweet Late’ cultivars, for 2013 and 2014 year experiments (left scale), and in ‘Lapins’ cultivar for 2014 experiment (right scale), during storage at 2 °C + 1 day at 20 °C. Data are the mean ± SE. Different lower case letters show significant differences between control and treated fruit for each sampling date in 2013 (x, y) and in 2014 (a, b), while capital letters show significant differences along storage time in 2013 (X, Y, Z) and in 2014 (A, B, C).

phenolic concentration at harvest in control fruit was similar in ‘Sweet Heart’ and ‘Sweet Late’ cultivars for both, 2013 and 2014 years ( $\approx 75\text{--}80\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$ ), while 2-fold higher concentration was found in ‘Lapins’ cultivar ( $\approx 140\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$ ), showing that this cultivar has elevated content of phenolics as compared with others (Díaz-Mula et al., 2009; Serradilla et al., 2012). However, in MeSa-treated cherries phenolic concentration was significantly ( $p < 0.05$ ) higher

than in controls, in the three cultivars and for both years. Phenolic concentration increased in control fruit along storage, although in ‘Sweet Late’ cultivar a decrease occurred after prolonged storage, which could be attributed to an advancement of the ripening and senescence processes in this cultivar, as previously reported for other sweet cherry cultivars (Gonçalves et al., 2004; Serrano et al., 2009; Valero et al., 2011). However, in treated cherries total phenolic

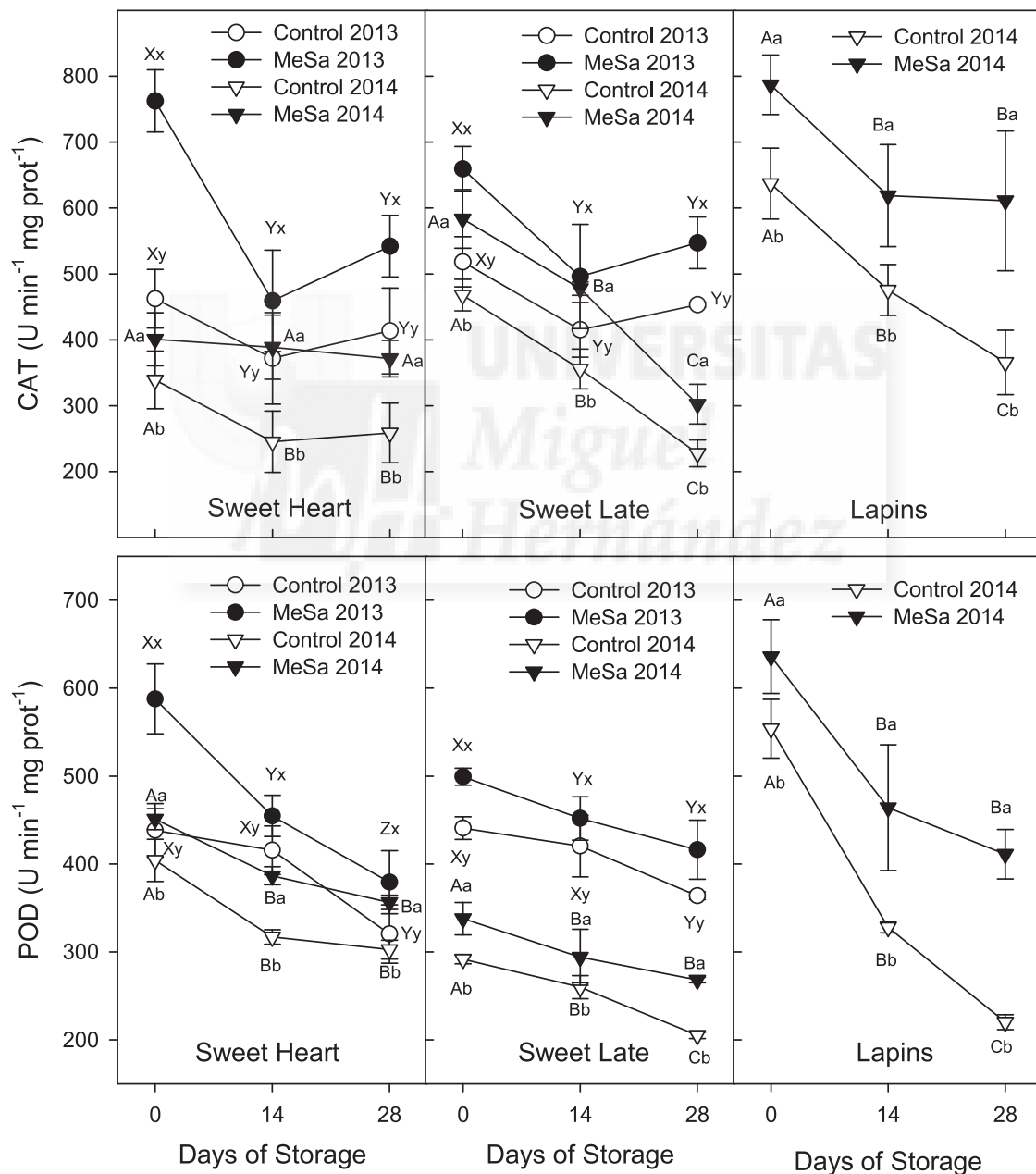


**Fig. 3.** Correlation between hydrophilic antioxidant activity (H-TAA) and total anthocyanin or total phenolic concentration (a), taking into account all data from all years and cultivars, and correlations between lipophilic antioxidant activity (L-TAA) and carotenoids concentration (b) taking into account data from control and treated cherries for each cultivar and growing season.

concentration was significantly ( $p < 0.05$ ) higher than in controls along the storage period. A similar pattern to that of total phenolic compounds was found for total anthocyanin content (Fig. 2), that is, it increased along storage in control and treated fruit for all cultivars and years, except for control 'Sweet Late' in the year 2014, in which anthocyanin content increased during the first 14 days and then decreased during the rest of storage. Nevertheless, as commented above for phenolic content, preharvest MeSa treatments led to fruit with significantly ( $p < 0.05$ ) higher anthocyanin concentration, at harvest time and along storage in the three cherry cultivars and for both experimental years.

No previous papers are available about the effects of preharvest MeSa treatment on fruit bioactive compounds for comparative purposes, although some evidences of postharvest treatments

exist. Thus, postharvest MeSa treatments (at 0.1 or 0.01 mM) of pomegranate significantly increased total phenolics and anthocyanins with respect to controls during long term storage (Sayyari et al., 2011a). Similar results were obtained in pomegranates treated with ASA, a close analogue of MeSa (Sayyari et al., 2011b). By other hand, postharvest treatment of sweet cherry with SA or ASA, led to fruit with higher phenolic and anthocyanin concentrations along storage, as compared with those found in control cherries (Valero et al., 2011). Accordingly, the postharvest treatment of cornelian cherry fruit with 1 or 2 mM SA increased total phenolics, flavonoids and anthocyanins, due to the effect of SA on inducing phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity, which catalyzes the first and committed step in the phenyl propanoid pathway and is therefore involved in the biosynthesis of phenolic

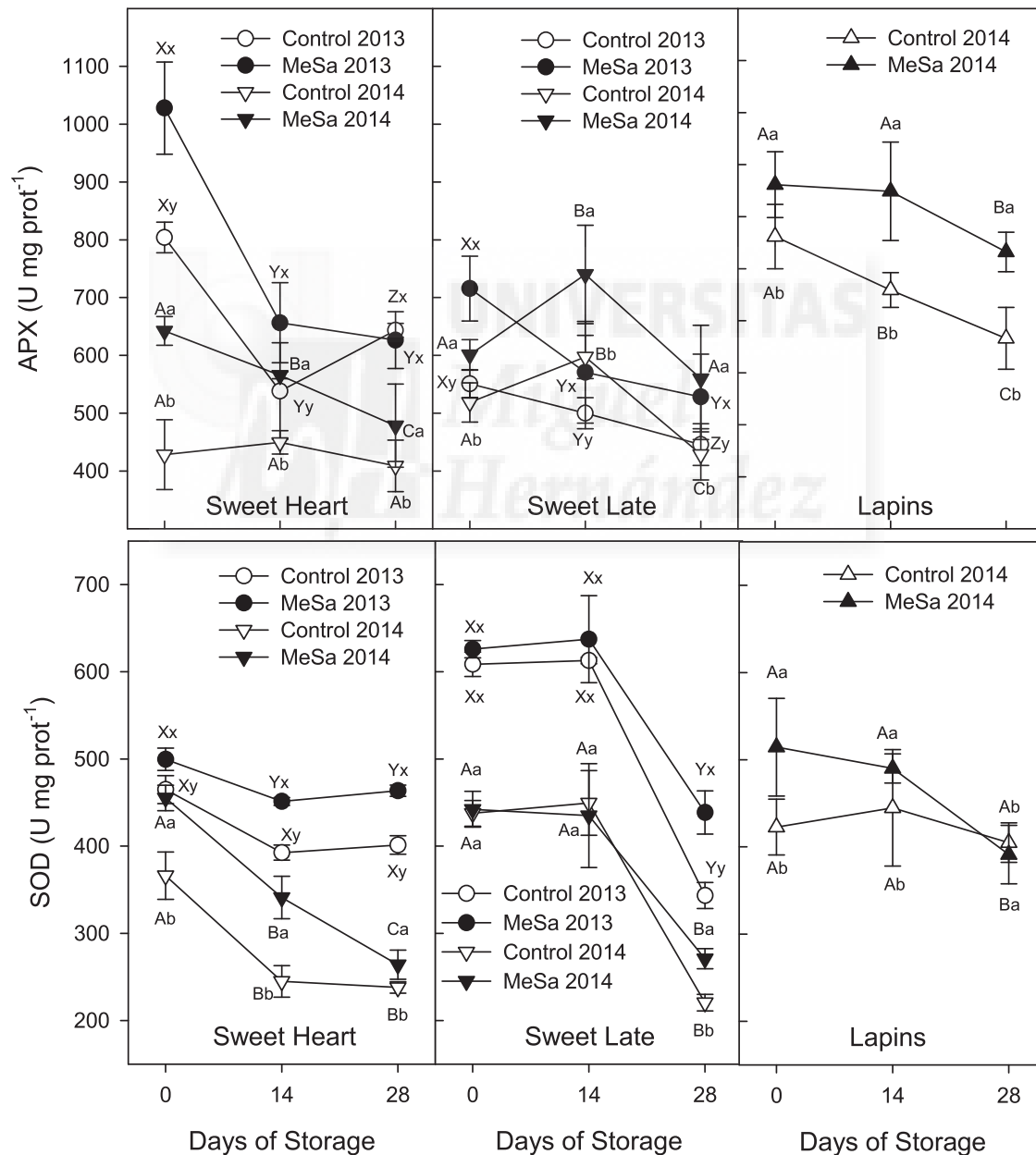


**Fig. 4.** Catalase (CAT) and peroxidase (POD) activities in control and methyl salicylate (MeSa) treated 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars, for 2013 and 2014 year experiments and in 'Lapins' cultivar for 2014 experiment, during storage at 2°C+1 day at 20°C. Data are the mean  $\pm$  SE. Different lower case letters show significant differences between control and treated fruit for each sampling date in 2013 (x, y, z) and in 2014 (a, b, c), while capital letters show significant differences along storage time in 2013 (X, Y, Z) and in 2014 (A, B, C).

compounds such as flavonoids, anthocyanidins and phenylpropanoids (Dokhanieh et al., 2013). Similar increases of phenolic content, via stimulating the activity of PAL have been reported in apricot fruit after post-harvest SA treatments (Wang et al., 2015). In addition, treatment of grape berry with SA induced the accumulation of PAL mRNA and the synthesis of new PAL protein (Chen et al., 2006).

Total antioxidant activity in the hydrophilic extracts (H-TAA) was also higher at harvest time in MeSa-treated cherries than in controls, for the three cherry cultivars and for both years. This H-TAA increased along storage and was 2-fold higher in ‘Lapins’ than in ‘Sweet Heart’ and ‘Sweet Late’ (data not shown). In fact, H-TAA was highly correlated with both, total anthocyanin ( $R^2=0.843$ ) and total phenolic ( $R^2=0.874$ ) concentrations (Fig. 3), taking into account all data from 2013 and 2014 years

of control and treated fruit of the three cultivars along the storage. These results show that anthocyanins and other phenolics could be the main hydrophilic compounds responsible for antioxidant activity of cherry fruit, as previously reported (Díaz-Mula et al., 2009; Ballistreri et al., 2013; Giménez et al., 2014). Thus, MeSa, as a safe signaling molecule, could enhance nutritional quality and improve health promoting properties of cherry fruit consumption, given the reported effect of anthocyanins and other phenolics on reducing the risk of several diseases, such as cancer, diabetes, Alzheimer’s and cardiovascular diseases (McCune et al., 2011; Norberto et al., 2013). By other hand, L-TAA was very low as compared with H-TAA and no significant effect of MeSa treatment was observed on L-TAA, either at harvest time or along storage (data not shown). Accordingly, carotenoids concentration at harvest was  $\approx 0.45\text{--}0.50\text{ mg }100\text{ g}^{-1}$  in ‘Sweet Heart’ and ‘Sweet



**Fig. 5.** Ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) activities in control and methyl salicylate (MeSa) treated ‘Sweet Heart’ and ‘Sweet Late’ cultivars, for 2013 and 2014 year experiments and in ‘Lapins’ cultivar for 2014 experiment, during storage at 2 °C + 1 day at 20 °C. Data are the mean ± SE. Different lower case letters show significant differences between control and treated fruit for each sampling date in 2013 (x, y) and in 2014 (a, b), while capital letters show significant differences along storage time in 2013 (X, Y, Z) and in 2014 (A, B, C).

Late' for 2013 and 2014 and slightly lower for 'Lapins' ( $\approx 0.40 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), without significant effect of MeSa treatments, except for 'Sweet Heart' in 2014, in which carotenoids concentration at time of harvest was significantly higher than in controls ( $0.54 \pm 0.02$  and  $0.43 \pm 0.01 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , respectively). Carotenoids concentration increased along storage in control and treated fruit of all cultivars, although without significant differences ( $p < 0.05$ ) attributed to treatment (data not shown). However, a high correlation was found between L-TAA and carotenoids (Fig. 3) in the three sweet cherry cultivar and in both growing seasons, taking into account data for control and treated fruit ( $R^2 = 0.593\text{--}0.889$ ), which would indicate that carotenoids are the main lipophilic bioactive compounds contributing to L-TAA. However, since L-TAA was ten-fold lower than H-TAA, the main compounds contributing to the antioxidant capacity or sweet cherry are hydrophilic ones, as previously reported (Valero et al., 2011; Díaz-Mula et al., 2012), which have been significantly ( $p < 0.05$ ) increased by preharvest MeSa treatments.

### 3.2. Antioxidant enzymes

SOD, CAT, POD and APX have been implicated in senescence and stress responses in vegetable tissues, since efficient activity of these antioxidant enzymes is essential for avoiding ROS caused damages (Hodges et al., 2004; Kumar et al., 2014). The present results show a general trend in those antioxidant enzymes, that is, decreases along storage, although important differences existed between control and treated cherries, among cultivars and growing seasons. CAT activity at harvest was significantly higher in MeSa treated cherries than in control in the three studied cultivars, and data for 2013 year were higher than those from 2014 in 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars (Fig. 4). CAT activity decreased along storage, especially from day 0 to 14, although CAT activity was significantly higher in MeSa-treated than in control fruit, for all cultivars and growing seasons. A similar behavior was observed for POD activity, that is, POD decreased along storage and the activity was significantly higher in MeSa treated cherries than in controls (Fig. 4). For this antioxidant enzyme the highest activity at harvest was found in 'Lapins' and comparing both years, higher values were found in 2013 than in 2014 for both 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars. APX activity at harvest was also higher in treated than in control fruit, although its evolution along storage was dependent on year and cultivar. Thus, in 'Sweet Heart' cultivar decreases in APX activity along storage were observed in samples of 2013 and in treated fruit of 2014, while no significant changes occurred in control fruit of 2014. APX activity also decreased during storage in control and treated fruit of 'Sweet Late' in 2013 experiment, as well as in 'Lapins' cultivar, while in control and treated 'Sweet Late' cherries in 2014 experiments this antioxidant enzyme increased from harvest until day 14 and then decreased (Fig. 5). Nevertheless, APX activity was always higher in treated than in control fruit. Finally, a general decrease along storage was also found in SOD activity, with values being significantly higher in MeSa-treated fruit than in controls, except for 'Sweet Late' cultivars, for which significant differences were just found at the last sampling date (Fig. 5).

In previous reports, it has been found that several postharvest treatments with significant effect on delaying the fruit postharvest ripening and senescence processes maintained higher activity of these antioxidant enzymes. Thus, in sweet cherry CAT and POD activities were higher in chitosan-coated fruit than in controls (Dang et al., 2010). Accordingly to the present results, He et al. (2013) reported decreases in CAT and POD activities during storage of sweet cherry, although the vacuum cooling treatment before storage led to higher activities in treated than in control cherries and delayed the postharvest ripening process. Moreover,

postharvest treatments of sweet cherry with hexanal or 1-methylcyclopropene led to increases in SOD activity and lower decreases in APX activity during storage as compared with control cherries (Sharma et al., 2010). In addition, SOD, CAT and POD activities were also increased in peach fruit by postharvest treatments with SA, although in this fruit these antioxidant enzymes increased along storage at  $0^\circ\text{C}$  (Tareen et al., 2012). Moreover, postharvest treatment of mango and sugar apple fruit with SA maintained higher levels of SOD, CAT and APX activities during storage as compared to those found in control fruit, which were accompanied by lower superoxide anion content and lower lipoxigenase activity (Ding et al., 2007; Mo et al., 2008). Superoxide radical accumulation during storage was also reduced in apricot by 1.0 and 2.0 mM SA treatment, due to an increase on SOD activity (Wang et al., 2015). This is of great importance, since the accumulation of  $\text{O}_2^{\cdot-}$  may activate the formation of more reactive ROS like  $\text{OH}^\bullet$  or  $^1\text{O}_2$ , leading to peroxidation of membrane lipids and proteins and to acceleration of senescence process (Hodges et al., 2004; Mondal et al., 2009). Thus, the increased activity of these antioxidant enzymes, together with increased concentrations of antioxidants compounds, found in sweet cherry fruit (at harvest and during storage), as a consequence of MeSa treatments, could contribute to cleaning the ROS generated during the postharvest ripening process and in turn, to delay the postharvest ripening and senescence processes. These effects could explain the maintenance of fruit quality attributes during prolonged storage found in sweet cherries from MeSa treated trees (Giménez et al., unpublished data) as well as in pomegranate (Sayyari et al., 2011a), orange (Ahmad et al., 2013), mango (Ding et al., 2007), sugar apple (Mo et al., 2009), table grape (Khalil, 2014), or peach (Wang et al., 2006) after postharvest treatment with SA or ASA.

In conclusion, overall results show that preharvest treatment of sweet cherry trees with MeSa led to fruit with increased content on antioxidant compounds, such as total phenolics and anthocyanins, at harvest time and during storage, leading to increase in nutritional quality and to improve health promoting properties of cherry fruit. In addition, the increase in antioxidant enzymes by MeSa treatments may result in a high ROS scavenging potential, and in turn in delaying senescence process leading to the preservation of fruit quality attributes.

### Acknowledgements

This work has been co-funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and European Commission with FEDER Funds through Project AGL2012-35402/ALI. Authors would express the valuable help of "Finca Toli S.L." for providing the sweet cherry fruit and technical support during the 2013 and 2014 experiments, as well as of "Cerezas Aitana" during the 2014 experiments.

### References

- Ahmad, S., Singh, Z., Iqbal, Z., 2013. Effect of preharvest sprays of salicylic acid on the shelf life and quality of 'Lane Late' sweet orange (*Citrus sinensis* L.) cold storage. *Acta Hort.* 1012, 103–112.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Ballistreri, G., Continella Gentile, A.A., Amenta, M., Fabroni, S., Rapisarda, P., 2013. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem.* 140, 630–638.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Chen, J.-Y., Wen, P.-F., Kong, W.-F., Pan, Q.-H., Zhan, J.-C., Li, J.-M., Wan, S.-B., Huang, W.-D., 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biol. Technol.* 40, 64–72.
- Chan, Z., Wang, Q., Xu, X., Meng, X., Qin, G., Li, B., Tian, S., 2008. Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic



- acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics* 8, 4791–4807.
- Dang, Q.F., Yan, J.Q., Li, Y., Cheng, X.J., Liu, C.S., Chen, X.G., 2010. Chitosan acetate as an active coating material and its effects on the Storing of *Prunus avium* L. *J. Food Sci.* 75, S125–S131.
- Díaz-Mula, H.M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Serrano, M., 2009. Organoleptic, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Sci. Technol. Int.* 15, 535–543.
- Díaz-Mula, H.M., Serrano, M., Valero, D., 2012. Alginate coatings preserve fruit quality and bioactive compounds during storage of sweet cherry fruit. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2990–2997.
- Ding, Z.S., Tian, S.P., Zheng, X.L., Zhou, Z.W., Xu, Y., 2007. Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiol. Plant* 130, 112–121.
- Dokhanieh, A.Y., Aghdam, M.S., Fard, J.R., Hassanpour, H., 2013. Postharvest salicylic acid treatment enhances antioxidant potential of cornelian cherry fruit. *Sci. Hortic.* 154, 31–36.
- Fung, R.W.M., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tian, M., 2004. MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 166, 711–719.
- Fung, R.W.M., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tao, Y., Tian, M., 2006. Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 163, 1049–1060.
- Giménez, M.J., Valverde, J.M., Valero, D., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Castillo, S., 2014. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chem.* 160, 226–232.
- Gonçalves, B., Landbo, A.K., Knudse, D., Silva, A.P., Moutinho-Pereira, J., Rosa, E., Meyer, A.S., 2004. Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52, 523–530.
- Han, J., Tian, S.P., Meng, X.H., Ding, Z.H., 2006. Response of physiologic metabolism and cell structures in mango fruits to exogenous methyl salicylate under low temperature stress. *Physiol. Plant* 128, 125–133.
- Hayat, S., Ahmad, A., 2007. *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Springer, Dordrecht.
- He, S.Y., Zhang, G.C., Yu, Y.Q., Li, R.G., Yang, Q.R., 2013. Effects of vacuum cooling on the enzymatic antioxidant system of cherry and inhibition of surface-borne pathogens. *Int. J. Refrig.* 36, 2387–2394.
- Hodges, D.M., Lester, G.E., Munro, K.D., Toivonen, P.M.A., 2004. Oxidative stress: importance for postharvest quality. *HortScience* 39, 924–929.
- Khalil, H.A., 2014. Effects of pre- and postharvest salicylic acid application on quality and shelf life of 'Flame Seedless' grapes. *Eur. J. Hortic. Sci.* 79, S8–15.
- Kumar, D., 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.* 228, 127–134.
- Kumar, S., Yadav, P., Jain, V., Malhotra, S.P., 2014. Isozymes of antioxidative enzymes during ripening and storage of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk.). *J. Food Sci. Technol.* 51, 329–334.
- McCune, L.M., Kubota, C., Stendell-Hollins, N.R., Thomson, C.A., 2011. Cherries and health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 1–12.
- Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R., Xie, J., Li, W., 2008. Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 88, 2693–2699.
- Mondal, K., Malhotra, S.P., Jain, V., Singh, R., 2009. Oxidative stress and antioxidant systems in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15, 327–334.
- Norberto, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., Calhau, C., 2013. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *J. Funct. Foods* 5, 1518–1528.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., 2011a. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chem.* 124, 964–970.
- Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Serrano, M., 2011b. Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biol. Technol.* 60, 136–142.
- Serradilla, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., López-Corrales, M., Córdoba, M.D.G., 2012. Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain). *Food Chem.* 133, 1551–1559.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2741–2745.
- Serrano, M., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valero, J.M., Valero, D., 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3240–3246.
- Sharma, M., Jacob, J.K., Subramanian, J., Paliyath, G., 2010. Hexanal and 1-MCP treatments for enhancing the shelf life and quality of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Sci. Hortic.* 125, 239–247.
- SPSS, 2011. Version 22.0 for Windows. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Tareen, M.J., Abbasi, N.A., Hafiz, I.A., 2012. Postharvest application of salicylic acid enhanced antioxidant enzyme activity and maintained quality of peach cv. 'Flordaking' fruit during storage. *Sci. Hortic.* 142, 221–228.
- Usenik, V., Fabčić, J., Štampar, F., 2008. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* 107, 185–192.
- Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., 2011. Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5483–5489.
- Valero, D., Mirdeghan, S.H., Sayyari, M., Serrano, M., 2015. Vapor treatments, chilling, storage, and antioxidants in pomegranates. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Processing and Impact on Active Components in Food*. Academic Press, London, pp. 189–196.
- Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S., Archbold, D.D., 2006. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 244–251.
- Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J., Jiang, W., 2015. The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Sci. Hortic.* 181, 113–120.
- Yao, H., Tian, S., 2005. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 35, 253–262.
- Zapata, P.J., Martínez-Esplá, A., Guillén, F., Díaz-Mula, H.M., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D., 2014. Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.* 98, 115–122.
- Zhang, Z., Huber, D.J., Rao, J., 2013. Antioxidant systems of ripening avocado (*Persea americana* Mill.) fruit following treatment at the preclimacteric stage with aqueous 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 76, 58–64.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments



María José Giménez<sup>a</sup>, Juan Miguel Valverde<sup>a</sup>, Daniel Valero<sup>a,\*</sup>, Fabián Guillén<sup>a</sup>, Domingo Martínez-Romero<sup>a</sup>, María Serrano<sup>b</sup>, Salvador Castillo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Technology, EPSO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Department of Applied Biology, EPSO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 February 2014

Received in revised form 21 March 2014

Accepted 22 March 2014

Available online 1 April 2014

## Keywords:

*Prunus avium* L.

Quality

Anthocyanins

Phenolics

Antioxidant activity

Carotenoids

## ABSTRACT

The effects of salicylic acid (SA) or acetylsalicylic acid (ASA) treatments during on-tree cherry growth and ripening on fruit quality attributes, especially those related with the content on bioactive compounds and antioxidant activity were analysed in this research. For this purpose, two sweet cherry cultivars, 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', were used and SA or ASA treatments, at 0.5, 1.0 and 2.0 mM concentrations, were applied at three key points of fruit development (pit hardening, initial colour changes and onset of ripening). These treatments increased fruit weight and ameliorated quality attributes at commercial harvest, and led to cherries with higher concentration in total phenolics and in total anthocyanins, as well as higher antioxidant activity, in both hydrophilic and lipophilic fractions. Thus, preharvest treatments with SA or ASA could be promising tools to improve sweet cherry quality and health beneficial effects for consumers.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Salicylic acid (SA) is an endogenous plant substance playing important roles in plant growth and development, acting as a signal molecule related to defence responses and providing protection from pathogen attack (Beckers & Spoel, 2006; Hayat & Ahmad, 2007; Volt, Klessig, & Park, 2008). Thus, postharvest SA treatments have been effective on decreasing decay in a wide range of fruits. For instance, in sugar apple fruits SA postharvest treatment lowered decay rate (related with higher levels of antioxidant enzymes during storage), ethylene production and delayed the postharvest ripening process, leading to improved storability (Mo et al., 2008). Accordingly, SA reduced decay caused by *Botrytis cinerea* in tomato, decreased ethylene production and delayed the ripening process (Wang, Li, Qin, Li, & Tian, 2011), as well in kiwifruit (Fatemi, Mohammadi, & Aminifard, 2013). In addition, postharvest SA treatments reduced chilling injury (CI) in mango, related to reduction in lipoxygenase activity and increases in superoxide dismutase (SOS), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) antioxidant enzymes (Ding, Tian, Zheng, Zhou, & Xu, 2007), plum (Luo, Chen, & Xie, 2011), peach (Cao, Hu, Zheng, & Lu, 2010) and pomegranate (Sayyari, Babalar, Kalantari, Serrano, & Valero,

2009; Sayyari, Castillo, Valero, Díaz-Mula, & Serrano, 2011) among others. By other hand, acetylsalicylic acid (ASA) is a close analogue of SA and when applied exogenously is converted to SA spontaneously, having similar effects to SA in plant defence processes (Hayat & Ahmad, 2007). In addition, ASA postharvest treatments was similarly effective as SA on reducing CI in pomegranate fruits (Sayyari et al., 2011) as well as on inhibiting kiwifruit ripening and ethylene production (Yin et al., 2013).

However, papers about the effect of SA preharvest treatments on fruit quality are scarce and most of them are related to the SA effect on inducing defence responses against fungal attack. Moreover, as far as we know, no information is available about the effects of preharvest ASA treatments on fruit quality. Thus, SA applied as foliar spray or added to the irrigation solution to strawberry plants, in combination with postharvest treatments, reduced fruit fungal decay and retained overall quality after 14 days of storage (Babalar, Asghari, Talaei, & Khosroshahi, 2007). In jujube plants, preharvest foliar sprays with 2.0 mM of SA inhibited decay caused by *Alternaria alternata* and *Monillinia fructicola* at harvest, and the inhibitory effect persisted during long-term storage (Cao, Yan, Zhao, & Jiang, 2013). In sweet cherry, Yao and Tian (2005) showed that 2.0 mM SA treatment of sweet cherry trees 3 days before harvesting induced fruit resistance against *M. fructicola* during storage, by increasing  $\beta$ -1,3-glucanase, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and peroxidase (POX) activities.

\* Corresponding author. Tel.: +34 96 6749743; fax: +34 96 6749677.

E-mail address: [daniel.valero@umh.es](mailto:daniel.valero@umh.es) (D. Valero).

Accordingly, resistance of sweet cherry fruit to *Penicillium expansum* during postharvest storage was increased by SA treatment of trees at harvest date, especially in fruit harvested at early maturity stage (Chan et al., 2008).

However, the effects of SA or ASA treatments during cherry growth and ripening on tree on fruit quality attributes, especially those related with the content on bioactive contents and antioxidant activity have not been investigated previously, being the main objective of the present research. For this purpose, two sweet cherry cultivars were used and SA or ASA treatments were applied at three different concentrations and at three key points of fruit development on tree.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and experimental design

Two sweet cherry cultivars ('Sweet Heart' and 'Sweet Late'), cultivated in a commercial plot from "Fincas Toli S.L." located at Jumilla (Murcia, Spain), were used in this experiment along the developmental cycle during the 2013 spring-summer period. Both cultivars showed the same day for full blossom (DAFB, February 20th) but commercial harvest dates were July 8th (138 DAFB) and July 16th (145 DAFB) for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively. Three trees were selected completely at random for each cultivar and treatment: control (distilled water), salicylic acid (SA) at 3 concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 mM), and acetylsalicylic acid (ASA) at 3 concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 mM). Freshly prepared solutions (containing 0.5% of Tween 20) were foliar sprayed with a mechanical mist sprayer (7.5 L/tree) and repeated at 3 dates of the growth cycle: T1 (at pit hardening, 98 days after full blossom, DAFB), T2 (initial colour changes, 112 DAFB) and T3 (onset of ripening, 126 DAFB). These dates corresponded to key events in fruit developmental process, according to previous experiments (Díaz-Mula et al., 2009). One week before T1 treatment, 20 fruits were labelled around the equatorial perimeter of each tree, in which fruit growth was followed by measuring polar, suture and cheek diameters, and then fruit volume was calculated as previously reported (Díaz-Mula et al., 2009). On a weekly basis, from 1 week before the T1 treatment to commercial harvesting, 20 fruits (similar to those labelled) for each tree (or replicate) were picked for further analytical determinations: fruit firmness, colour, total soluble solids (TSS), total acidity (TA) and respiration rate. In addition, the content of bioactive compounds (total phenolics, total anthocyanins and total carotenoids) and total antioxidant activity were determined in fruits from control and those trees treated with 0.5 mM SA and 1.0 mM ASA, since with these concentrations the highest effects on fruit quality parameters were found. At time of harvesting, 100 cherries from each tree, cultivar and treatment were randomly picked for determining the fruit weight and used for sensorial analysis.

### 2.2. Cherry quality parameters

Colour was determined in each cheek of 20 fruits from each replicate by using a Minolta colorimeter (CRC200, Minolta Camera Co., Japan), using the CIELab coordinates and expressed as  $a^*/b^*$  index. Fruit firmness was determined independently in 20 fruits of each replicate using a TX-XT2i Texture Analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK) interfaced to a personal computer, with a flat steel plate mounted on the machine. For each fruit, the cheek diameter was measured and then a force that achieved a 3% deformation of the fruit diameter was applied. Results were expressed as the force–deformation ratio ( $N\ mm^{-1}$ ) and were the mean  $\pm$  SE. After that the 20 fruits of each sample were cut in small pieces to obtain

a homogeneous sample for each replicate. Total soluble solids (TSS) were determined in duplicate in the juice obtained from 5 g of each sample with a digital refractometer Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan) at 20 °C, and expressed as  $g\ 100\ g^{-1}$  (mean  $\pm$  SE). Total acidity (TA) was determined in duplicated in the same juice by automatic titration (785 DMP Titrino, Metrohm) with 0.1 N NaOH up to pH 8.1, using 1 mL of diluted juice in 25 mL distilled  $H_2O$ , and results (mean  $\pm$  SE) expressed as g malic acid equivalent  $100\ g^{-1}$  fresh weight. For respiration rate, each replicate (20 fruits) was placing in a 0.5-L glass jar hermetically sealed with a rubber stopper for 30 min.  $CO_2$  production was quantified using a Shimadzu<sup>TM</sup> GC-2010 with thermal conductivity detector (TCD). Results were the mean  $\pm$  SE and expressed as  $mg\ kg^{-1}\ h^{-1}$ .

### 2.3. Total phenolics, total anthocyanins, and total antioxidant activity determination

Phenolic extraction for sample was performed using water:methanol (2:8) containing 2 mM NaF (to inactivate polyphenol oxidase activity and prevent phenolic degradation) as described by Tomás-Barberán et al. (2001) and quantified using the Folin–Ciocalteu reagent and results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)  $100\ g^{-1}$  FW.

Total anthocyanins were determined according to previously reported (Serrano, Guillén, Martínez-Romero, Castillo, & Valero, 2005) and calculated as cyanidin 3-glucoside equivalent (CGE, molar absorption coefficient of  $23,900\ L\ cm^{-1}\ mol^{-1}$  and molecular weight of  $449.2\ g\ mol^{-1}$ ) and results expressed as  $mg\ 100\ g^{-1}$  FW, and were the mean  $\pm$  SE.

Total carotenoids were extracted according to Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993). Briefly, 2 g of sweet cherry fruit were extracted with acetone and shaken with diethyl ether and 10% NaCl for separation of the two phases. The lipophilic phase was washed with  $Na_2SO_4$  (2%), saponified with 10% KOH in methanol, and the pigments were subsequently extracted with diethyl ether, evaporated and then made up to 25 mL with acetone. Total carotenoids were estimated by reading the absorbance at 450 nm according to Valero et al. (2011) and expressed as mg of  $\beta$ -carotene equivalent ( $\beta$ -CE)  $100\ g^{-1}$ , taking into account the  $\epsilon_{cm}^{1\%} = 2560$ .

Total antioxidant activity (TAA) was quantified according to Serrano et al. (2009), which enables to determine TAA due to both hydrophilic (H-TAA) and lipophilic (L-TAA) compounds in the same extraction. Briefly, for each sample, five grams of tissue were homogenised in 5 mL of 50 mM phosphate buffer pH = 7.8 and 3 mL of ethyl acetate, and then centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4 °C. The upper fraction was used for L-TAA and the lower for H-TAA. For both cases, TAA was determined using the enzymatic system composed of the chromophore 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), the horse radish peroxidase enzyme (HRP) and its oxidant substrate (hydrogen peroxide), in which ABTS<sup>+</sup> radicals are generated and monitored at 730 nm. The decrease in absorbance after adding the pomegranate extract was proportional to TAA of the sample. A calibration curve was performed with Trolox ((R)-(+)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-croman-2-carboxylic acid) (0–20 nmol) from Sigma (Madrid, Spain), and results are expressed as mg of Trolox equivalent (TE)  $100\ g^{-1}$ .

### 2.4. Sensorial analysis

Ten panellists, previously trained with commercial samples of sweet cherries were asked to perform a sensory characterisation of the batches studied. For that, 5 fruits, selected at random from the 100 cherries harvested at the last sampling date from each tree, cultivar and treatment, were presented to each panellist. Descriptive analysis was performed according to international standard

methods (ISO 4121-2006) to evaluate appearance, skin colour, sweet cherry taste, sweetness, sourness, and firmness by using a numbered scale from 1 (poor) to 10 (excellent).

### 2.5. Statistical analysis

Data for the analytical determinations were subjected to analysis of variance (ANOVA). Sources of variation were storage time and treatment. Mean comparisons were performed using HSD the Duncan's multiple test to examine if differences were significant at  $p < 0.05$ . Linear regressions were performed between H-TAA and total anthocyanins or L-TAA and total carotenoids taking into account data from the last sampling dates and treatments for each cultivar and then regression correlation was calculated. All analyses were performed with SPSS software package v. 12.0 for Windows.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sweet cherry quality parameters

Sweet cherry growth for both cultivars 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' followed a double-sigmoid curve as previously reported for other cultivars (Díaz-Mula et al., 2009) reaching the final size after 133 and 140 days for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively (Fig. 1). All treatments with salicylic acid (SA) and acetylsalicylic acid (ASA) at the three assayed concentrations (0.5, 1 and 2 mM) increased fruit volume with respect to controls, the effect being higher for the 'Sweet Late' cultivar than for 'Sweet Heart'. The most effective concentration of ASA was 1 mM with increases in fruit volume of 47 and 59% for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively at the harvesting date, while for SA the most effective concentration was 0.5 mM with increases of 41 and 51%. The same behaviour was found when fruit weight was determined based on the average weight of 100 cherries (Table 1). The preharvest application of ASA at 1 mM increased fruit weight a 24 and 39% for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively. By other hand, 0.5 mM was the most effective SA dose on increasing fruit weight,  $\approx 13$  and 37% for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively. Thus, as higher cherry sizes are more appreciated by consumers and reach higher prices at markets than small ones, these treatments could improve economic performance of this crop.

Fruit colour of sweet cherry is one of the most important attributes related to fruit quality, together with TSS, TA and firmness. Previous reports demonstrated that  $a^*/b^*$  ratio is an appropriate index to follow the ripening process on tree, since increases sharply with ripening and important differences are found among cultivars. Increases on TSS and TA have also been found during on-tree ripening on a wide range of sweet cherry cultivars, while fruit firmness decreased (Serrano et al., 2005, 2009; Díaz-Mula et al., 2009). Accordingly, in 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars, colour  $a^*/b^*$  index, TSS and TA increased, while decreases occurred in fruit firmness in both, control and SA- or ASA-treated fruits, and then, just data of the last sampling date are provided for these quality parameters (Fig. 2 and Table 1). The application of both treatments (ASA and SA) affected the external colour of sweet cherry cultivars, since significantly higher  $a^*/b^*$  index was observed in treated than in control cherries at the harvesting date, especially for 1 mM ASA and 0.5 mM SA treatments (Fig. 2).

Fruit firmness at harvest was generally higher in treated than in control fruits for both cultivars. The fruits with the highest firmness were those treated with ASA at 1 mM for 'Sweet Late' and those treated with SA at 0.5 mM for 'Sweet Heart' cultivars. With respect to TSS, the observed effects depended on treatment and cultivar (ranging between 17 and 21 g 100 g<sup>-1</sup>), although the application of the highest concentration (2 mM) for both ASA and SA in 'Sweet Late' and for SA in 'Sweet Heart' led to the lowest levels of TSS at harvesting date. Thus, in SA or ASA 2.0 mM treated trees, in general, a delay in the fruit ripening process could occur, since sugar content increases with on-tree sweet cherry ripening (Díaz-Mula et al., 2009; Serradilla et al., 2012). Nevertheless, TSS values of control and treated cherries of both cultivars were above the limit of 14–16 g 100 g<sup>-1</sup> suggested by Crisosto, Crisosto, and Metheny (2003) as acceptable for marketing in a wide range of sweet cherry cultivars. However, no significant differences were observed in the final values of TA due to the treatments of SA or ASA independently of the cultivar and concentration. Accordingly, no significant effect of preharvest 2.0 mM SA applied four times at 15 days intervals before harvesting were found on TA or TSS in pineapple fruits (Lu, Sun, Li, Shi, & Sun 2011). Finally, any effect was also observed among control and treated cherries on respiration rate, although the rate of CO<sub>2</sub> production was 2-fold higher in 'Sweet Heart' (18–22 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) than in 'Sweet Late' (9–11 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). However, postharvest SA treatment of plum

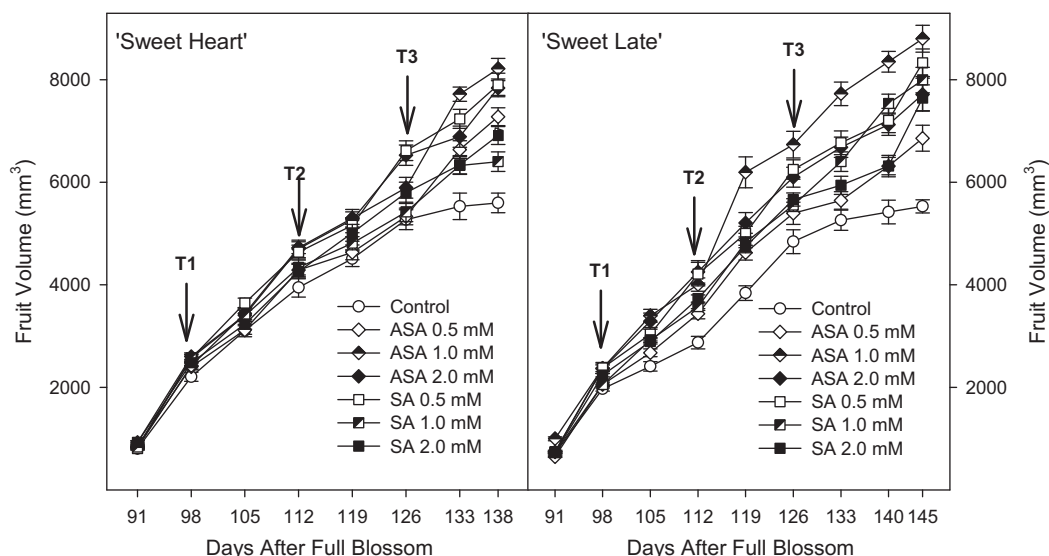


Fig. 1. Evolution of fruit volume of 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cherry cultivars as affected by salicylic acid (SA) and acetylsalicylic acid (ASA) treatments at 0, 0.5, 1 and 2 mM applied at 3 different dates of fruit development (T1, T2 and T3). Data are the mean  $\pm$  SE of 60 fruits.

**Table 1**

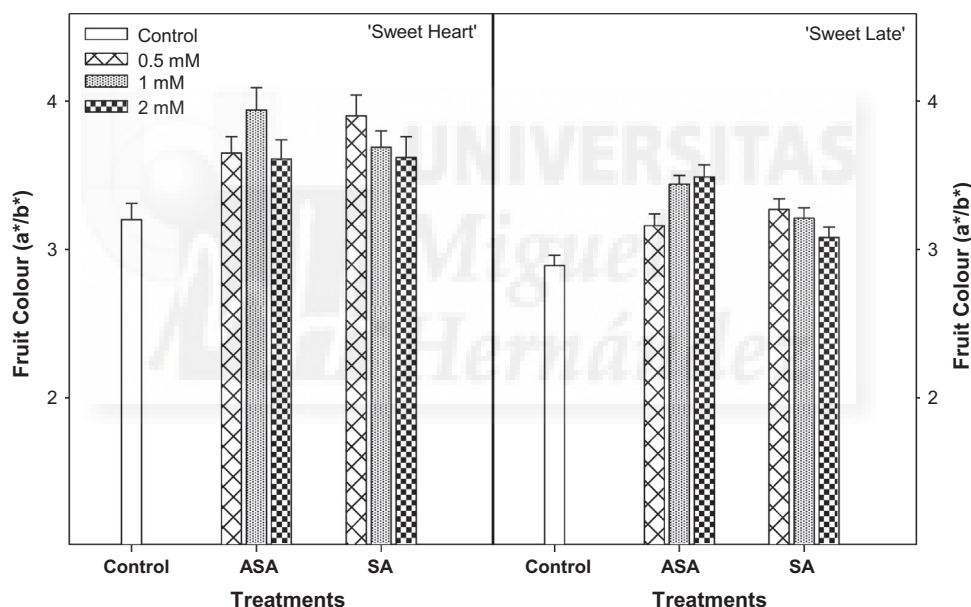
Fruit quality parameters: weight<sup>A</sup> (g), firmness<sup>A</sup> (N mm<sup>-1</sup>), total soluble solids<sup>B</sup> (TSS, g 100 g<sup>-1</sup>), total acidity<sup>B</sup> (TA, g 100 g<sup>-1</sup>) and respiration rate<sup>B</sup> (mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) at harvest in 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cultivars as affected by salicylic acid (SA) or acetyl salicylic acid (ASA) treatments.<sup>\*</sup>

	Weight	Firmness	TSS	TA	Respiration rate
<b>'Sweet Heart'</b>					
Control	6.77 ± 0.13 a	2.95 ± 0.15 a	19.82 ± 0.11 a	1.48 ± 0.10 a	20.62 ± 1.63 a
SA (0.5 mM)	7.64 ± 0.14 b	3.87 ± 0.08 b	20.83 ± 0.06 b	1.50 ± 0.08 a	22.14 ± 1.40 a
SA (1.0 mM)	7.13 ± 0.15 c	3.43 ± 0.13 c	20.00 ± 0.32 a	1.45 ± 0.09 a	20.27 ± 0.54 a
SA (2.0 mM)	7.38 ± 0.13 bc	3.52 ± 0.10 c	18.85 ± 0.23 c	1.56 ± 0.08 a	22.77 ± 1.17 a
ASA (0.5 mM)	7.52 ± 0.06 b	3.37 ± 0.09 c	19.50 ± 0.55 a	1.49 ± 0.12 a	19.48 ± 2.13 a
ASA (1.0 mM)	8.34 ± 0.09 d	3.39 ± 0.09 c	20.13 ± 0.12 a	1.58 ± 0.07 a	20.73 ± 1.02 a
ASA (2.0 mM)	7.83 ± 0.22 b	2.73 ± 0.10 a	19.30 ± 0.21 a	1.60 ± 0.09 a	18.06 ± 1.33 a
<b>'Sweet Late'</b>					
Control	6.62 ± 0.24 a	3.01 ± 0.05 a	20.01 ± 0.20 a	1.39 ± 0.09 a	9.66 ± 0.64 a
SA (0.5 mM)	9.08 ± 0.21 b	3.63 ± 0.14 b	19.65 ± 0.16 a	1.45 ± 0.11 a	10.21 ± 0.56 a
SA (1.0 mM)	8.71 ± 0.14 b	3.43 ± 0.07 b	19.45 ± 0.38 a	1.46 ± 0.09 a	10.97 ± 0.43 a
SA (2.0 mM)	8.55 ± 0.08 c	3.21 ± 0.11 a	17.33 ± 0.47 b	1.49 ± 0.08 a	9.24 ± 0.13 a
ASA (0.5 mM)	7.30 ± 0.08 c	3.46 ± 0.08 b	19.53 ± 0.62 a	1.46 ± 0.09 a	10.63 ± 0.98 a
ASA (1.0 mM)	9.19 ± 0.18 b	3.81 ± 0.18 c	21.63 ± 0.22 c	1.44 ± 0.08 a	9.46 ± 0.48 a
ASA (2.0 mM)	8.83 ± 0.23 b	3.64 ± 0.11 b	18.28 ± 0.16 d	1.44 ± 0.07 a	9.74 ± 1.88 a

<sup>A</sup> Data are the mean ± SE of determinations performed in 60 fruits.

<sup>B</sup> Data are the mean ± SE of determinations performed in duplicate in 3 samples of 20 fruits.

<sup>\*</sup> For each parameter and cultivar different letters show significant differences at  $p < 0.05$ .



**Fig. 2.** Fruit colour at commercial harvest of 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cherry cultivars as affected by salicylic acid (SA) and acetylsalicylic acid (ASA) treatments at 0, 0.5, 1 and 2 mM. Data are the mean ± SE of 60 fruits.

decreased and delayed the onset of the climacteric respiration rate (Luo et al., 2011), as well as in sugar apple fruits (*Annona squamosa*, Mo et al., 2008), which is crucial to prolong the storage life of fruits.

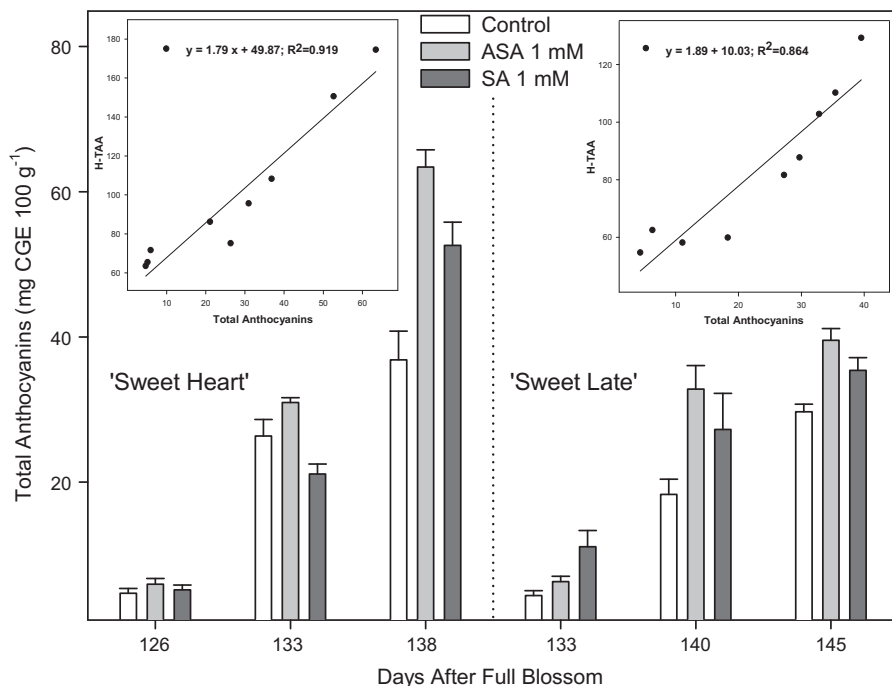
Sensory analysis revealed no significant differences between control and SA or ASA treated fruits for both sweet cherry cultivars about appearance, colour, sweetness and sourness (data not shown), showing that these treatments did not impart negative effects on fruit taste and flavour. For all parameters, cultivars and treatments the given scores were between 8 and 9, that is between very good and excellent attribute.

### 3.2. Bioactive compounds and total antioxidant activity

According to the above results, bioactive compounds and antioxidant activity were determined in the samples from ASA at 1 mM and SA 0.5 mM treated since the application of these concentrations led to the highest effects on fruit size, fruit weight, fruit

firmness and TSS. Antioxidant compounds in food from plants are classified as hydrophilic (phenolics, including anthocyanins, ascorbic acid, resveratrol and glutathione) and lipophilic (carotenoids, tocopherols and tocotrienols), both groups having beneficial effects on human health (Martin, Zhang, Tonelli, & Petroni, 2013; Valero & Serrano, 2010).

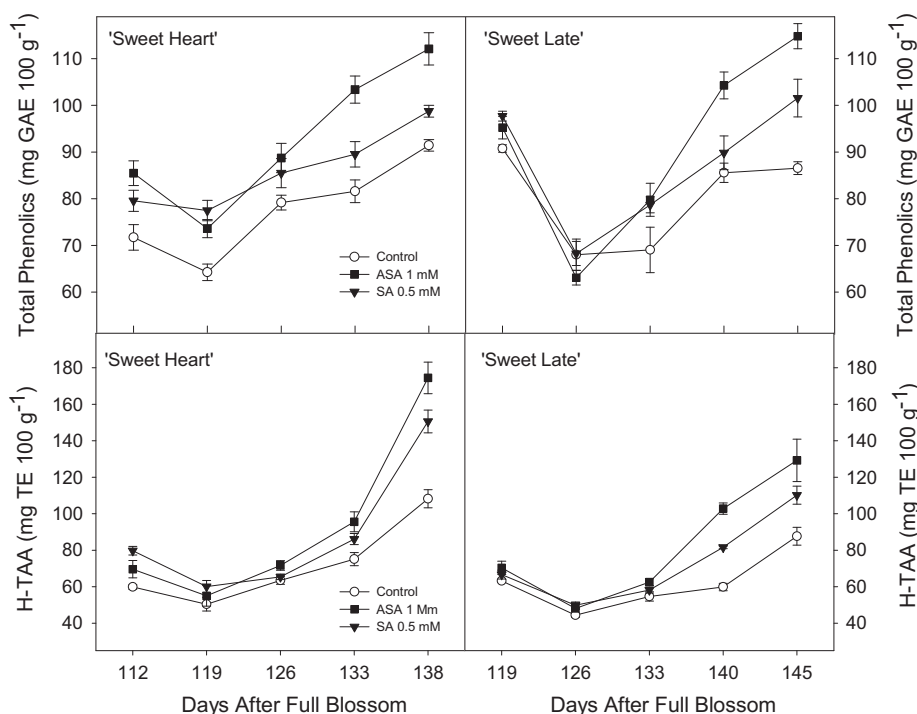
Total anthocyanins are displayed at the last 3 sampling dates for both cultivars, since the flesh was still light and occurrence of anthocyanins was very low for previous dates. As expected, total anthocyanins increased during the ripening on-tree reaching final concentrations of 40 and 30 mg 100 g<sup>-1</sup> for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively in control samples, showing a medium content of anthocyanins as compared with other cherry cultivars (Ballistreri et al., 2013; Díaz-Mula et al., 2009; Serra, Duarte, Bronze, & Duarte, 2011). Interestingly, the pre-harvest applications of both compounds increased the content of total anthocyanins for both cultivars, the most effective treatment being ASA 1 mM (Fig. 3).



**Fig. 3.** Total anthocyanins evolution during the last 2 weeks of fruit development of 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cherry cultivars as affected by salicylic acid (SA) at 0.5 mM and acetylsalicylic acid (ASA) at 1 mM treatments. Insert figures represent linear correlation between hydrophilic total antioxidant activity (H-TAA) and total anthocyanins for each cultivar. Data are the mean  $\pm$  SE of determinations performed in duplicate in 3 samples of 20 fruits.

The concentration of total phenolics initially decreased and afterwards increased during the last 3 sampling dates reaching concentration of 90 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> in control cherries for both cultivars (Fig. 4). Thus, the content of total phenolics at commercial harvest in these cultivars could be considered as middle, as compared with the range of 50–160 mg 100 g<sup>-1</sup> reported for other cultivars (Ballistreri et al., 2013; Díaz-Mula et al., 2009; Serra et al.,

2011; Serradilla et al., 2012). The application of both treatments (ASA and SA) led to an increase in the content of total phenolics, which was evident for the second application (T2), the highest effect being observed in those fruits treated with ASA 1 mM (110 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>). Accordingly, pre-harvest foliar sprayed trees with SA induced also enhancement of phenolic content at harvest in Navel oranges (Huang, Xia, Lu, Hu & Xu, 2008) and

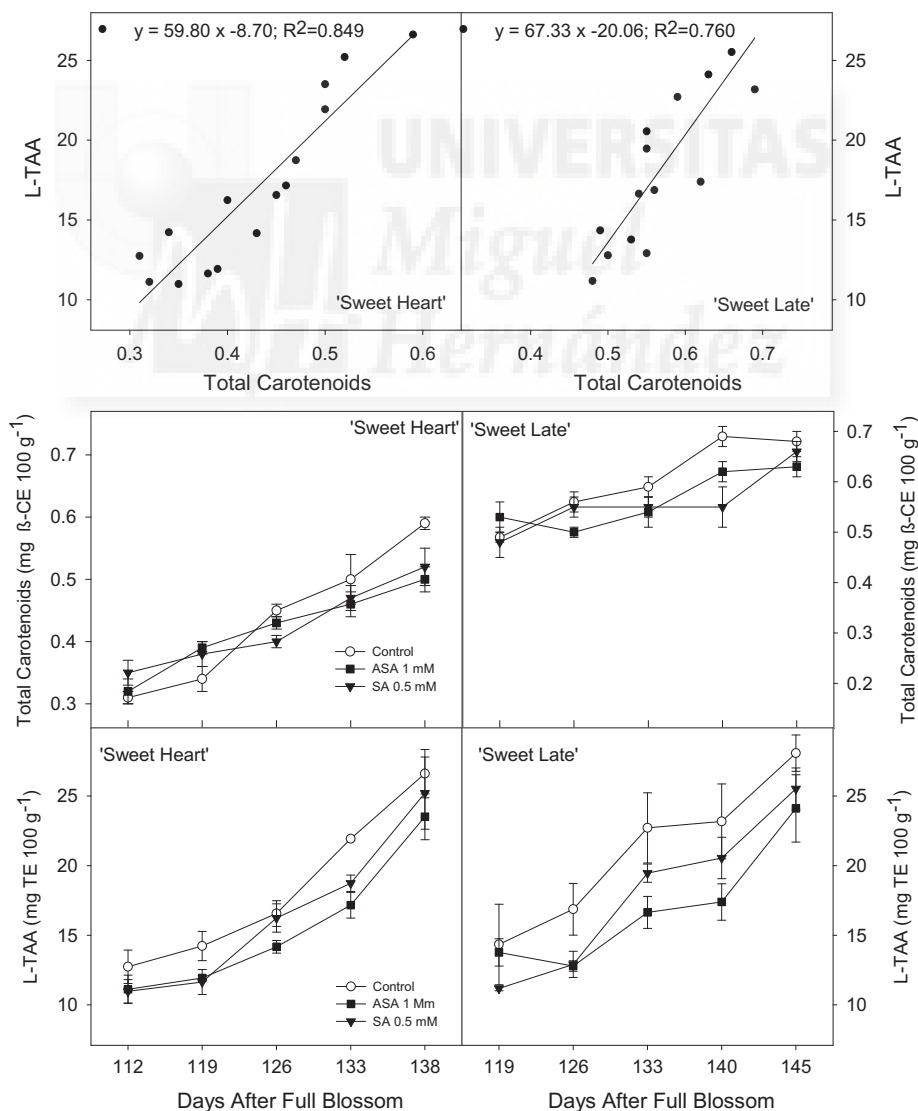


**Fig. 4.** Evolution of total phenolics and hydrophilic total antioxidant activity (H-TAA) of 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cherry cultivars as affected by salicylic acid (SA) at 0.5 mM and acetylsalicylic acid (ASA) at 1 mM treatments. Data are the mean  $\pm$  SE of determinations performed in duplicate in 3 samples of 20 fruits.

jujube (Cao et al., 2013) fruits. However, the precise mechanism by which salicylates increase phenolic compounds is not yet elucidated. One explanation could be attributed to the role of SA as a signal molecule inducing the biosynthesis of defence compounds, such as phenolics. In addition, it has been shown that SA stimulates phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity (Yao & Tian, 2005), which could be responsible for *de novo* synthesis of phenolic compounds. Moreover, SA and ASA applied as postharvest treatments led to higher levels of bioactive compounds and antioxidant activity as compared with controls in sweet cherry (Valero et al., 2011), pomegranate (Sayyari et al., 2011) and plum (Davarynejad, Zarei, Nasrabadi, & Ardakani, 2013), which could be attributed to an increase of the endogenous concentration of SA and ASA in these fruits.

A similar effect of ASA and SA treatments was shown when total antioxidant activity (TAA) in the hydrophilic fraction (H-TAA) was measured. That is, H-TAA increased in both sweet cherry cultivars during the last two weeks of fruit development, this increase being higher in fruits from ASA and SA treated trees than in those from control trees. Nevertheless, for this parameter the effect of ASA and SA treatment was higher for 'Sweet Heart' than for 'Sweet Late' cultivar (Fig. 4). Similar effect of SA and ASA on increasing H-TAA,

when applied as postharvest treatments, has been previously reported in sweet cherry (Valero et al., 2011) and pomegranate (Sayyari et al., 2011). In previous reports, in a wide range of sweet cherry cultivars, H-TAA has been correlated with the content of phenolic compounds (Ballistreri et al., 2013; Díaz-Mula et al., 2009; Serra et al., 2011; Usenik, Fabčić, & Štampar, 2008), similarly to that found in the present research. Thus, H-TAA was positively correlated with total phenolics in 'Sweet Heart' ( $y = 2.44x - 124$ ;  $R^2 = 0.744$ ) and in 'Sweet Late' ( $y = 1.44x - 52$ ;  $R^2 = 0.769$ ), showing that the major hydrophilic compounds with antioxidant activity are those with phenolic nature. Moreover, since the content of total phenolics was similar in both cultivars, the highest H-TAA found in 'Sweet Heart' with respect to 'Sweet Late' could be attributed to the higher total anthocyanin content of 'Sweet Heart'. In fact, correlations between H-TAA and total anthocyanins were higher than those between H-TAA and total phenolics, with regression curves being  $y = 1.79x + 50$ ;  $R^2 = 0.919$  and  $y = 1.89x + 40$ ;  $R^2 = 0.864$  for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively (Fig. 4 inserts). However, the antioxidant activity may also depend on the presence of specific phenolic compounds, such as flavan-3-ols, flavonols and procyanidins (Kelebek & Sellik, 2011). In fact, in 'Sweet Late' and 'Sweet Heart' cultivars we have found that the main individual



**Fig. 5.** Evolution of total carotenoids and lipophilic total antioxidant activity (L-TAA) of 'Sweet Heart' and 'Sweet Late' cherry cultivars as affected by salicylic acid (SA) at 0.5 mM and acetylsalicylic acid (ASA) at 1 mM treatments. Figures on the top represent linear correlation between lipophilic total antioxidant activity (L-TAA) and total carotenoids for each cultivar. Data are the mean  $\pm$  SE of determinations performed in duplicate in 3 samples of 20 fruits.

flavonols were myricetin 3-rutinoside followed by quercetin 3-rutinoside and kaempferol 3-rutinoside in both sweet cherry cultivars, and the main chlorogenic acid derivatives, neochlorogenic acid and chlorogenic acid, and all of them were significantly increased by OA treatment (unpublished data). In addition, it has been reported that phenolic compounds and especially anthocyanins are the main responsible moieties for the human health benefits of cherry consumption, such as the growth inhibition of cancer cells derived from colon and stomach (Serra et al., 2011).

The content of total carotenoids increased during fruit ripening on-tree reaching final concentration in control fruits ca. 0.6 and 0.7 mg  $-CE\ 100\ g^{-1}$  for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively (Fig. 5). A similar evolution was found for treated cherries, although final levels were significantly reduced without significant differences between ASA and SA treatments. This pattern of total carotenoids was also followed by L-TAA, which exhibited the highest values in control cherries as compared with treated fruits, and thus high correlation was found between L-TAA and total carotenoids with correlation curves of  $y = 59.80x - 8.70$ ;  $R^2 = 0.849$  and  $y = 67.33x - 20.06$ ;  $R^2 = 0.760$  for 'Sweet Heart' and 'Sweet Late', respectively (Fig. 5 inserts). Thus, carotenoid could be the main lipophilic compounds with antioxidant activity in sweet cherry.

#### 4. Conclusion

The overall results showed that pre-harvest treatments with SA and ASA increased some quality parameters, such as fruit weight, firmness, the content of bioactive compounds, and antioxidant properties of sweet cherry at commercial harvest. Among the assayed doses (0.5, 0.1 and 2.0 mM), the highest effects were found with SA at 0.5 mM and ASA at 1 mM in both sweet cherry cultivars. By other hand, any detrimental effects of these treatments on TSS, TA, taste or flavour were observed. Thus, SA and ASA are plant natural compounds that could be considered as promising tools for improving fruit quality attributes and enhancing the potential health benefits of cherry consumption.

#### Acknowledgements

This work has been funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Project AGL2012-35402/ALI and European Commission with FEDER funds. The authors thank "Finca Toli Frutas, S.L." for permission to use their plots, for provision of the cherries and for the technical support received.

#### References

Babalar, M., Asghari, M., Talei, A., & Khosroshahi, A. (2007). Effect of pre- and postharvest salicylic acid treatment on ethylene production, fungal decay and overall quality of Selva strawberry fruit. *Food Chemistry*, *105*, 449–453.

Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., & Rapisarda, P. (2013). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chemistry*, *140*, 630–638.

Beckers, G. J. M., & Spoel, S. H. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, *8*, 1–10.

Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., & Lu, B. (2010). Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *58*, 93–97.

Cao, J. K., Yan, J. Q., Zhao, Y. M., & Jiang, W. B. (2013). Effects of four pre-harvest foliar sprays with  $\beta$ -aminobutyric acid or salicylic acid on the incidence of post-harvest disease and induced defence responses in jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) fruit after storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *88*, 338–344.

Chan, Z., Wang, Q., Xu, X., Meng, X., Qin, G., Li, B., et al. (2008). Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics*, *8*, 4791–4807.

Crisosto, C. H., Crisosto, G. M., & Metheney, P. (2003). Consumer acceptance of 'Brooks' and 'Bing' cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biology and Technology*, *28*, 159–167.

Davarynejad, G. H., Zarei, M., Nasrabadi, M. E., & Ardakani, E. (2013). Effects of salicylic acid and putrescine on storability, quality attributes and antioxidant

activity of plum cv. 'Santa Rosa'. *Journal of Food Science and Technology* (in press). <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1232-3>.

Díaz-Mula, H. M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P. J., Guillén, F., et al. (2009). Organoleptic, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Science and Technology International*, *15*, 535–543.

Ding, Z. S., Tian, S. P., Zheng, X. L., Zhou, Z. W., & Xu, Y. (2007). Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiologia Plantarum*, *130*, 112–121.

Fatemi, H., Mohammadi, S., & Aminifard, M. H. (2013). Effect of postharvest salicylic acid treatment on fungal decay and some postharvest quality factors of kiwi fruit. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *46*, 1338–1345.

Hayat, S., & Ahmad, A. (2007). *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Dordrecht: Springer.

Huang, R., Xia, R., Lu, Y., Hu, L., & Xu, Y. (2008). Effect of pre-harvest salicylic acid spray treatment on post-harvest antioxidant in the pulp and peel of 'Cara cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*, 229–236.

ISO 4121-2006. (2006). [http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?codigo=N0037445&tipo=N&PDF=Si#Uuo\\_4T15PLI](http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?codigo=N0037445&tipo=N&PDF=Si#Uuo_4T15PLI) (accessed 18.12.2013).

Kelebek, H., & Selli, S. (2011). Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*, 2530–2537.

Lu, X., Sun, D., Li, Y., Shi, W., & Sun, G. (2011). Pre- and post-harvest salicylic acid treatments alleviate internal browning and maintain quality of winter pineapple fruit. *Scientia Horticulturae*, *130*, 97–101.

Luo, Z., Chen, C., & Xie, J. (2011). Effect of salicylic acid treatment on alleviating postharvest chilling injury of 'Qingnai' plum fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *62*, 115–120.

Martin, C., Zhang, Y., Tonelli, C., & Petroni, K. (2013). Plants, diet, and health. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 19–46.

Mínguez-Mosquera, M. I., & Hornero-Méndez, D. (1993). Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*, 1616–1620.

Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R., Xie, J., & Li, W. (2008). Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*, 2693–2699.

Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Serrano, M., & Valero, D. (2009). Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, *53*, 152–154.

Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz-Mula, H. M., & Serrano, M. (2011). Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, *60*, 136–142.

Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R., & Duarte, C. M. M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, *125*, 318–325.

Serradilla, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., López-Corrales, M., & Córdoba, M. D. G. (2012). Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain). *Food Chemistry*, *133*, 1551–1559.

Serrano, M., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., et al. (2009). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 3240–3246.

Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., & Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 2741–2745.

SPSS. (2001). *VERSION 12.0 for Windows*. Chicago, IL: SPSS Inc.

Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4748–4760.

Usenik, V., Fabčić, J., & Štampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, *107*, 185–192.

Valero, D., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., et al. (2011). Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 5483–5489.

Valero, D., & Serrano, M. (2010). *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*. Boca Raton: CRC-Taylor & Francis.

Volt, A. C., Klessig, D. F., & Park, S. W. (2008). Systemic acquired resistance: The elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, *11*, 436–442.

Wang, Y. Y., Li, B. Q., Qin, G. Z., Li, L., & Tian, S. P. (2011). Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. *Scientia Horticulturae*, *129*, 183–188.

Yao, H., & Tian, S. (2005). Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology*, *35*, 253–262.

Yin, X. R., Zhang, Y., Zhang, B., Yang, S. L., Shi, Y. N., Ferguson, I. B., et al. (2013). Effects of acetylsalicylic acid on kiwifruit ethylene biosynthesis and signaling components. *Postharvest Biology and Technology*, *83*, 27–33.