

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**  
**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**“EFECTO DE LA APLICACIÓN CON ELICITORES  
SOBRE LA CALIDAD GENERAL DE GRANADA  
(*Punica granatum L.*)”**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Julio - 2018**

Autora: Bianca Adina Birza

Tutores: Antonio Fabián Guillén Arco

María Emma García Pastor



## RESUMEN

Los elicitores son aquellas sustancias que inducen un cambio fisiológico en la planta y a partir de la cual se activan una serie de mecanismos similares a las respuestas de defensa que, en condiciones naturales, se desencadenarían tras la infección de un patógeno o un estímulo del medio, afectando así al metabolismo de la planta y aumentando la síntesis de compuestos fitoquímicos. Elicidores tales como el ácido oxálico se aplicaron en pre-cosecha sobre granados para tratar de evaluar si se obtenían mejoras en los frutos en el momento de la cosecha. Tras aplicar los tratamientos, y una vez evaluados los frutos, se observó que estos mostraron menores pérdidas de firmeza, y un mayor nivel en los parámetros de color por lo que se incrementó la calidad general de estos frutos. Asimismo también se obtuvo una mayor producción determinado por un mayor peso de los frutos.

**Palabras clave:** Granada, Ácido oxálico, Pre-cosecha, Elicitores, Recolección.

## ABSTRACT

Elicitors are substances which induce physiological changes in plants. Plants respond to these stress by activating an array of mechanisms, similar to the defense responses to pathogen infections or environmental stimuli, affecting the plant metabolism and enhancing the synthesis of phytochemicals. Elicitors as oxalic acid were applied at pre-harvest stage on pomegranate trees, to evaluate if these treatments were able to increase quality at harvest. After applied this treatment and once fruits were harvested and evaluated, results showed that these fruits had higher fruit firmness, and were able to induced and increased all colour parameters. On the other hand its metabolism was affected which leads to a higher general quality of the fruit as well as yield, because an increase on the weight of these fruits.

**Keywords:** Pomegranate, Oxalic acid, Pre-harvest, Elicitors, Harvest.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. La granada</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2. Características botánicas</b> .....	<b>8</b>
1.2.1. El cultivo de la granada.....	8
1.2.2. Taxonomía.....	9
1.2.3. Biología floral.....	9
<b>1.3. Composición química y nutricional</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Efectos beneficiosos de la granada.....	14
<b>1.4. Exigencias relativas a la calidad</b> .....	<b>15</b>
1.4.1. Factores pre-recolección que afectan a la calidad.....	16
1.4.2. Características físicas.....	17
1.4.3. Etapas de desarrollo de la fruta.....	17
1.4.4. Factores post-recolección.....	20
<b>1.5. Variedades de granada</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6. Elicitores</b> .....	<b>24</b>
1.6.1. Ácido oxálico.....	25
<b>1.7. Producción de granada e importancia económica</b> .....	<b>26</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1. Material vegetal</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2. Diseño experimental</b> .....	<b>32</b>

<b>3.3. Determinaciones analíticas</b> .....	<b>34</b>
3.3.1. Pérdida de peso.....	34
3.3.2. Determinación de CO <sub>2</sub> .....	34
3.3.3. Evaluación del color.....	36
3.3.4. Determinación de la firmeza.....	37
3.3.5. Evaluación de los sólidos solubles.....	38
3.3.6. Determinación del pH y de la acidez titulable.....	39
3.3.7. Determinación de las antocianinas totales.....	40
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1. Efecto del tratamiento con ácido oxálico en pre-cosecha sobre la producción de granada</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2. Evolución de la tasa de respiración y la pérdida de peso de las granadas tratadas con ácido oxálico y controles durante distintos tiempos de almacenamiento</b> .....	<b>47</b>
<b>4.3. Evolución del color de las granadas tratadas con ácido oxálico y controles durante distintos tiempos de almacenamiento</b> .....	<b>51</b>
4.3.1. Efecto sobre el color externo de las granadas.....	52
4.3.2. Efecto sobre el color de los arilos de las granadas.....	55
<b>4.4. Evolución de la firmeza de las granadas tratadas con ácido oxálico y controles durante distintos tiempos de almacenamiento</b> .....	<b>58</b>
<b>4.5. Evolución de los sólidos solubles totales de las granadas tratadas con ácido oxálico y controles durante distintos tiempos de almacenamiento</b> .....	<b>60</b>
<b>4.6. Evolución de la acidez titulable de los frutos tratados con ácido oxálico y controles durante distintos tiempos de almacenamiento</b> .....	<b>61</b>
<b>4.7. Evolución del contenido de antocianinas de los frutos tratados con ácido oxálico y controles durante distintos tiempos de almacenamiento</b> .....	<b>62</b>

<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>64</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>65</b>
<b>6.1. Páginas web consultadas</b> .....	<b>72</b>



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LA GRANADA.

El granado, perteneciente a la familia de las *Punicaceae*, es un pequeño árbol caducifolio, con porte arbustivo y una altura de entre 3 y 6 metros, siendo la granada su fruto. Las hojas del granado son de color verde brillante, lustrosas por el haz y con el borde entero. Las flores (*Fotografía 1*) son grandes y de color rojo, lustrosas y acampanadas, incluso, abigarradas y matizadas en blanco, en algunas variedades. Todas estas características morfológicas hacen que este árbol sea muy apreciado en jardinería como ornamental, ya que tampoco requiere cuidados especiales.



*Fotografía 1.* Flor del granado.

El fruto del árbol, representado en la *Fotografía 2*, es una baya globosa, denominada balausta, cuyo color puede ser rojo brillante o verde amarillento o blanquecino, coronado por un cáliz de 5 - 8 cm de diámetro, con cáscara coriácea y semillas en el interior. Las semillas, también representadas en la *Fotografía 2*, son gruesas, de consistencia leñosa y testa carnosa o pulposa, de forma prismática, muy jugosas, color que varía desde el apreciado rubí intenso hasta blanco y sabor agridulce que puede recordar ligeramente al de las grosellas.



**Fotografía 2.** Fruto del granado y sus arilos.

Los frutos climatéricos son aquellos capaces de seguir madurando tras la recolección, debido a un aumento en su tasa de respiración (crisis climatérica) y su producción de etileno (principal hormona responsable de la maduración y el envejecimiento del fruto), incluso una vez separados de la planta.

Sin embargo, los frutos no climatéricos, como la granada, son aquellos frutos cuya maduración no está controlada hormonalmente por el etileno. En los frutos no climatéricos tampoco se producen crisis climatéricas ni modificaciones fisiológicas tras la recolección.

## **1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.**

### **1.2.1. El cultivo de la granada.**

El granado se cultiva desde tiempos muy remotos, encontrándose indicios del consumo de su fruto en tumbas egipcias de 2.500 años a. C. Se cree que fueron los cartagineses quienes introdujeron el granado en la región mediterránea a raíz de las Guerras Púnicas, motivo por el cual se denominan *Punica granatum*. Posteriormente, los españoles llevaron los granados a América, tras el descubrimiento de aquellas tierras.

En la actualidad, el cultivo de granados se extiende en países de la cuenca mediterránea (Norte de África, España y Grecia), Afganistán, Israel, Brasil y California. España es uno de los principales países productores del mundo (superficie cultivada superior a 4.700 Ha), siendo el mayor productor (aprox. 56.000 toneladas) y exportador de Europa. Esta producción se concentra fundamentalmente en la zona levantina de Alicante y Murcia. Su cultivo se extiende desde el mes de septiembre hasta enero, si bien los mejores frutos son los recolectados entre los meses de Octubre y Diciembre.

### **1.2.2. Taxonomía.**

La granada pertenece a la familia *Pinicaceae*, la cual está formada por un solo género, *Punica*, y por dos especies: *P. protopunica* Balf. (que se encuentra en Socorta, Yemen) y *P. granatum* L.. Según Smith (1976), *P. Granatum*. tiene  $2n=2x = 16, 18$  cromosomas. La especie *P. granatum* tiene dos subespecies, *chlorocarpa* y *prophyrocarpa*. La más antigua se encuentra en la región de Transcaucasus (Armenia, Georgia y Azerbaiyán), mientras que la última se encuentra en Asia central (Patil y Karale, 1990). Los granados son arbustos grandes o árboles pequeños. La granada enana (*P. Granatum* L. var. *nana*) es una variedad en miniatura de granado más conveniente para la producción de planta de pote.

### **1.2.3. Biología floral.**

La granada florece una vez al año en los climas subtropicales, mientras que en los climas tropicales florece en casi todas las épocas del año. En cuanto al árbol, en las zonas con bajas temperaturas en invierno, es de hoja caduca, en cambio, en condiciones tropicales el árbol es imperecedero o parcialmente de hoja caduca.

En condiciones tropicales el brote de la flor ocurre en varios momentos. La duración entre el comienzo del alargamiento del brote de la flor (crecimiento) y la antesis varía entre 14 y 28 días, dependiendo de la variedad y de las condiciones climáticas (Gur, 1986). En climas subtropicales del hemisferio norte, el florecimiento ocurre a partir de la última semana de marzo hasta la segunda semana de mayo (Singh et al., 1978). Varios rubores distintos en el mismo árbol ocurren absolutamente con frecuencia.

Las flores son pedúnculos sensibles y cortos. Las flores son hermafroditas y masculinas, así como formas intermedias, y ocurren en el mismo árbol de la granada. El cáliz de las hermafroditas tiene forma de jarra con un ovario amplio bien desarrollado. Las flores masculinas son más pequeñas, con un cáliz acampanado y un ovario rudimentario. Las formas intermedias muestran varios grados de degeneración del ovario. La fruta que aparece de estas flores cae temprano, o si maduran y les falta formación (Ray, 2002). El porcentaje de hermafroditas, fuera del número total de flores en un árbol de la granada, depende del cultivo, de la estación de floración, y de otras condiciones ambientales desconocidas. En el comienzo de la estación de floración principal, este porcentaje es más alto que en el final de la estación (Gur, 1986).

### **1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL.**

Con respecto a la composición química y nutricional, cabe destacar la presencia de compuestos fenólicos, que ejercen una acción organoléptica y un posible efecto beneficioso para la salud. Desde el punto de vista organoléptico, los antocianos son los responsables del color rojo y los taninos del sabor astringente (el sabor acidulado es debido a los ácidos cítrico y málico). Por otra parte, los elagitaninos y, en menor proporción los antocianos, aportan propiedades antioxidantes.

La granada también es rica en otros componentes nutricionales, reflejados en la *Tabla 1*. El componente mayoritario es el agua, seguido de los carbohidratos. El contenido en grasas y proteínas es menor, por lo que el fruto tiene un bajo valor calórico (63 kcal/100 g). La granada también contiene una pequeña proporción de fibra alimentaria, localizada fundamentalmente en el piñón (3,5 g/100 g), siendo rica en potasio, calcio, magnesio, fósforo y hierro, pero pobre en sodio. Contiene, además, vitaminas del grupo B y C en concentraciones similares a otras frutas de alto consumo como ciruelas o manzanas.

**Tabla 1.** Composición nutricional de la granada por 100 g comestibles.

COMPONENTE	VALOR NUTRICIONAL	UNIDAD
<b>Proximales</b>		
Energía, total	261	kJ (kcal)
Grasa, total (lípidos totales)	0,3	g
Proteína, total	1	g
Agua (humedad)	80.2	g
<b>Hidratos de Carbono</b>		
Fibra, dietética total	3.5	g
Carbohidratos	13.7	g
<b>Grasas</b>		
Ácidos grasos, monoinsaturados totales	Traza	g
Ácidos grasos, poliinsaturados totales	Traza	g
Ácidos grasos, saturados totales	Traza	g
Colesterol	0	mg

Vitaminas		
Vitamina A equivalentes de retinol de actividades de retinos y carotenoides	7	µg
Vitamina E equivalentes de alfa tocoferol de actividades de vitámeros E	0.55	mg
Folato, total	29	µg
Equivalentes de niacina, totales	0.3	mg
Riboflavina	0.03	mg
Tiamina	0.05	mg
Vitamina B-6, total	0.2	mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	20	mg
Minerales		
Calcio	13	mg
Hierro, total	1	mg
Potasio	247	mg
Magnesio	6	mg
Sodio	4	mg
Fósforo	25	mg
Selenio, total	0.6	µg
Zinc (cinc)	0.1	mg

**Fuente:** BEDCA.

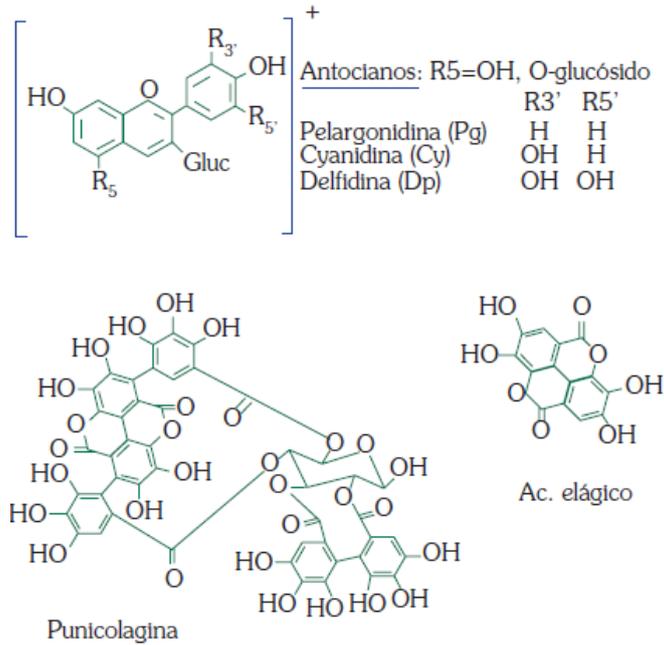
Los fenoles totales se encuentran en una elevada concentración (aprox. 83 mg / 100 g de porción comestible, o 250 mg / 100 mL), similar al contenido del vino tinto (valores medios de 203 mg / 100 mL) y muy superior al té verde (aprox. 103 mg / 100 mL) (Gil et al., 2000).

Dentro de esta fracción fenólica, los compuestos mayoritarios pertenecen al grupo de los antocianos (flavonoides coloreados), elagitaninos, derivados del ácido elágico y otros taninos hidrolizables.

En cuanto a los compuestos fenólicos coloreados, cabe destacar que la granada se caracteriza por la presencia de seis antocianos, derivados 3-glucósidos y 3,5-diglucósidos de delphinidina, cianidina y pelargonidina (*Imagen 1*). Los derivados de cianidina se encuentran en mayor proporción (por encima del 60 %), otorgando en total una alta concentración de estos flavonoides (alrededor de 13,3 mg / 100 g de porción comestible o 40 mg / 100 mL de zumo).

En el segundo grupo las punicalaginas, también representadas en la *Imagen 1*, son los compuestos más abundantes, alcanzando concentraciones de 52 mg / 100 mg de porción comestible (156 mg / 100 mL de zumo). El ácido elágico (*Imagen 1*) y sus derivados se encuentran en proporciones algo inferiores (4 mg / 100 mg o 12 mg / 100 mL zumo) y el total de otros taninos hidrolizables alcanza valores de 14 mg / 100 mg (42 mg/ 100 mL zumo).

Sin embargo, en algunos zumos comerciales se ha observado mayores concentraciones de los tres últimos compuestos (Gil et al., 2000), alterándose también la proporción de antocianos y ácido elágico según la variedad de granada (Martí et al., 2001; Pérez-Vicente et al., 2004).



**Imagen 1.** Principales compuestos fenólicos de la granada.  
**Fuente:** García-Viguera y Pérez Vicente, 2004.

### 1.3.1. Efectos beneficiosos de la granada.

Los efectos beneficiosos que la granada ejerce sobre la salud humana son conocidos desde años atrás, siendo reflejados en el libro “Historia Naturalista” de Plinio el Viejo y en pinturas y mosaicos de los tiempos de Pompeya (Melillo, 1994). Este fruto ha adquirido una fama de estimulante sexual, considerándose como un alimento afrodisíaco desde la época griega. La granada también presenta propiedades depurativas y diuréticas gracias a la presencia de elevadas concentraciones de agua y potasio, y a la baja concentración de sodio, como se ha observado en la *Tabla 1*. Esto, unido a la concentración de ácido cítrico también presente en la granada, favorece la eliminación del ácido úrico y sus sales a través de la orina, por lo que es aconsejable su ingesta en caso de padecer gota, litiasis renal por sales de ácido úrico, hipertensión u obesidad. La presencia de taninos y de los ácidos cítrico y málico confiere características antiinflamatorias. Estos

últimos también confieren antisépticas, mientras que los taninos aportan astringencia.

Las granadas presentan propiedades vermífugas, gracias a la presencia de alcaloides, en concreto de peleterina, que ese encuentra en la corteza y en las láminas internas que se encuentran entre los granos. Además, la corteza también presenta punicorteínas, que confieren efectos antitumorales a sus preparados (Kashiwada et al., 1992).

También se relacionan propiedades antisépticas y desinfectantes contra *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *S. cerevisiae* con la granada, y la presencia de sustancias que otorgan capacidad antioxidante (Singh et al., 2002), siendo los compuestos fenólicos los principales responsables de la misma. En estudios previos se muestran como estos frenan los procesos de envejecimiento, y aparición de enfermedades degenerativas en cerebro y cardiovasculares, cáncer y patologías asociadas (Tapiero et al., 2002).

El efecto antiarterioesclerótico del zumo, también ha sido descrito en humanos y ratones (Aviram et al., 2000) y puede ser recomendado para la prevención de enfermedades inflamatorias y apoplejías (Ness y Powles, 1997), así como en tratamientos contra el sida (Lee y Watson, 1998).

#### **1.4. EXIGENCIAS RELATIVAS A LA CALIDAD.**

Calidad hace referencia al grado de excelencia de un producto o de su conveniencia para un uso particular. Desde el punto de vista humano, la calidad abarca características sensoriales (aspecto, textura, sabor y aroma), valores nutritivos, componentes químicos, propiedades mecánicas, características funcionales y defectos (Abbott, 1999).

La producción, el manejo y la distribución de fruta y verdura fresca tienen como objetivo satisfacer al consumidor, por lo que existe una relación directa entre la satisfacción del consumidor y la calidad del producto.

El término calidad se ha definido de muchas maneras y en diversos contextos, habiendo poco acuerdo en cuanto a qué es, cómo se puede medir y/o cómo se relaciona con la aceptabilidad del consumidor. Sin embargo, se puede decir que la calidad es la ausencia de defectos o grado de excelencia. Por lo referente a las frutas, la calidad contempla tanto a las cualidades sensoriales que son percibidas fácilmente por los sentidos humanos, como a las cualidades ocultas tales como la seguridad y la nutrición (Shewfelt, 1999). Se puede diferenciar entre calidad y aceptabilidad, siendo la primera la combinación de características del producto por sí mismo, mientras que aceptabilidad se define como la respuesta del consumidor a esas características (Shewfelt, 1999). La definición del diccionario de la calidad abarca ambos conceptos (Neufeldt, 1988).

En el sector hortofrutícola, frutas y hortalizas son muy variables, pudiendo haber gran diferencia entre las piezas individuales de una fruta en comparación con el promedio. Es necesario determinar estadísticamente el número de pedazos y el número de mediciones requeridas por pieza para alcanzar un muestreo significativo y representativo (Abbott, 1999). La calidad de un producto vegetal está influenciada tanto por los factores pre- como post-recolección.

#### **1.4.1. Factores pre-recolección que afectan a la calidad.**

El primer criterio que influye en la decisión de compra de los consumidores es el aspecto. Este parámetro contempla el tamaño, la forma, el color y la ausencia de defectos. Numerosos factores pre-recolección influyen en

la calidad del producto cosechado, siendo estos: factores biológicos (patológicos, entomológicos, animales); factores fisiológicos (desórdenes fisiológicos, desequilibrio alimenticio, madurez); factores ambientales/culturales (clima, tiempo, suelos, relaciones del agua, intensidad de luz); daños mecánicos; materia extraña (crecimiento medio, residuos químicos); y variaciones y aberraciones genéticas (Kays, 1999).

#### **1.4.2. Características físicas.**

La decisión de compra también se ve influenciada por el tamaño de las piezas de fruta, pudiéndose determinar dicho parámetro mediante la medida de la dimensión (longitud, anchura, diámetro o circunferencia), peso y/o volumen.

#### **1.4.3. Etapas de desarrollo de la fruta.**

El desarrollo cronológico del florecimiento de la fruta a la madurez y a la senectud implica una secuencia de cambios físicos y bioquímicos, tanto a macro como a micro-niveles. Los mecanismos moleculares, celulares, y fisiológicos implicados en el desarrollo de la fruta (Gillaspy et al., 1993), la regulación de asimilar el suministro de fruta (Ho, 1996), y el papel de auxinas endógenas en el desarrollo de la fruta están bien documentados. Estos cambios que se producen durante el desarrollo se pueden clasificar en tres etapas: crecimiento, maduración y senectud.

En muchas especies, la estructura de crecimiento de la fruta está caracterizada por un período inicial con una rápida división de la célula y de desarrollo de las paredes de ésta, seguido por un período largo de extensión de la célula sobre todo por la vacuolación. La duración de la división de la célula durante el desarrollo de la fruta y el grado al cual la división de la célula

contribuye al crecimiento entero de la fruta, varía considerablemente entre las especies (Ho, 1996; Schechter et al., 1993).

Las curvas del crecimiento han sido descritas extensivamente. El gráfico podía ser un diagrama de los datos brutos del crecimiento contra el tiempo, o los porcentajes de valor máximo total de la cantidad del crecimiento contra el porcentaje del período total de crecimiento. Para cada tipo de fruta, la forma del diagrama de los datos medidos del crecimiento en un cierto plazo sigue un patrón distintivo que incluye etapas identificables de desarrollo (Opara, 2000). En el caso de las frutas, la estructura de crecimiento tiene una tendencia sigmoidea o doble-sigmoidea. Esta curva es resultado de la integración de los procesos de la división de célula y de la ampliación de la célula que se pueden separar temporal y espacialmente (Schechter et al., 1993).

En 1919, Connors subdividió lo que se ha conocido como la curva doble-sigmoidea de crecimiento en tres etapas (*Figura 1*), la fase inicial de crecimiento exponencial (etapa I), la fase de retraso (etapa II), y la segunda fase exponencial (etapa III).

Los frutos con pepitas tienen varias semillas relativamente pequeñas y un patrón sigmoideo de crecimiento de la fruta (Griggs e Iwakiri, 1956), mientras que los frutales de hueso tiene la semilla de mayor tamaño y, generalmente, una curva doble-sigmoidea de crecimiento (Watada et al., 1984; Schechter et al., 1993).

El tipo de datos usados para trazar el crecimiento (ejemplo datos primarios brutos contra datos de la tasa de crecimiento; longitud contra masa; masa fresca contra masa seca) también influye en la forma de la curva de crecimiento (Worrel et al., 1998). Varios investigadores han descrito resultados contradictorios en las estructuras de crecimiento para el mismo tipo de fruta. Hasta los años 80, se llegó a la conclusión de que el crecimiento de la fruta de la manzana sigue sobre todo una curva sigmoidea (Blanpied y Wilde, 1968). Sin embargo, muchos

investigadores han identificado un período corto o temporal de crecimiento reducido de la fruta, que dio lugar a una curva doble-sigmoidea de crecimiento (Magein, 1989).

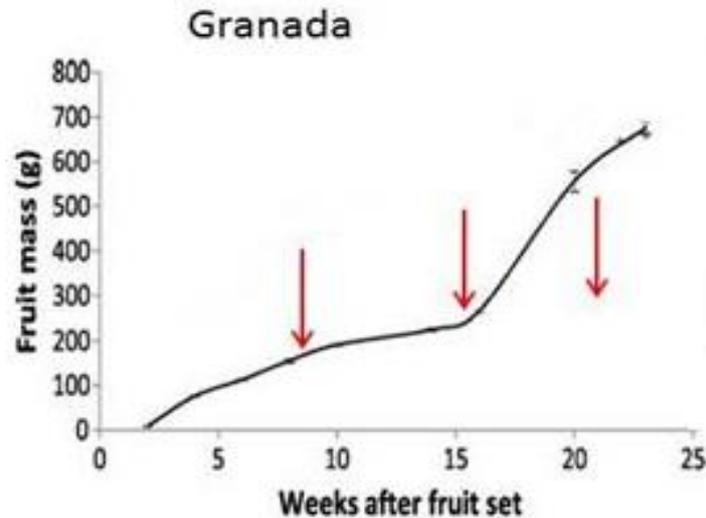


Figura 1. Curva de crecimiento de la granada.

Las diferencias son debidas a varios factores, incluyendo variaciones en el cultivo, errores de muestreo, diversos factores de la gestión de la huerta y diversos índices de crecimiento que dan curvas de crecimiento bastante diferentes (Opara, 2000). Magein (1989) observó que el crecimiento de la naranja 'Pippin de Cox' y la manzana 'Golden Delicious' siguió una tendencia sigmoidea simple usando el diámetro de la fruta, y cuando los datos absolutos de crecimiento fueron utilizados, la estructura de crecimiento era doble sigmoideo.

Desde una perspectiva fisiológica, la maduración se relaciona con los procesos asociados a completar el crecimiento natural y al desarrollo del tamaño completo. En tecnología de la post-recolección, la maduración se define comúnmente como "esa etapa en la cual una materia ha alcanzado una etapa suficiente de desarrollo que después de la cosecha y el manejo de la post-recolección, su calidad será por lo menos el mínimo aceptable por el consumidor final" (Reid, 2002). El término maduración contempla los procesos que

cualitativamente transforman la fruta madura mientras que alcanza el final de su período de crecimiento.

Los cambios en las propiedades físicas y químicas de la granada durante la maduración del fruto fueron descritos en estudios previos. Las frutas se clasificaron en tres diversas etapas: verde, mitad - maduro y maduro, y se encontró que la fruta de cada etapa no mostró ninguna diferencia estadística en longitud, diámetro o contenido de volumen si no que las diferencias fueron obtenidas en el peso total, contenido de semillas y densidades (Al-Maiman y Ahmad, 2002).

#### **1.4.4. Factores post-recolección.**

Actualmente existe una tendencia hacia la estandarización internacional de los grados de calidad que establecen las especificaciones estándar referentes a los productos frescos, dado al aumento del mercado internacional. La Comisión Europea fue una de las primeras organizaciones en desarrollar estándares internacionales para frutas frescas. 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 la vida útil son los siguientes: pérdida de peso, apariencia, textura, sabor/aroma y podredumbre. Además, durante el proceso de manipulación, se producen daños mecánicos que pueden acelerar los cambios en los factores anteriores, reduciendo con mayor rapidez 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, cuyo objetivo es reducir la tasa de deterioro y 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.

## 1.5. VARIEDADES DE GRANADA.

En España, las variedades de granado se clasifican en:

- Variedades dulces, que presentan 0,15 - 0,48 % de ácido cítrico.
- Variedades agridulces, con 0,54 - 0,91 % de ácido cítrico.
- Variedades agrias, que contienen 2,34 - 2,69 % de ácido cítrico (Melgarejo, 1993).

Como se ha mencionado previamente, las Comunidades de Murcia y Valenciana son las principales zonas productoras de granada a nivel nacional. En concreto, en los municipios alicantinos de Elche, Albatera, Crevillente y San Isidro, la variedad de granado más cultivada es la denominada Mollar de Elche, seguida por la variedad Valenciana. En estos municipios también se cultivan otras variedades como Albar, Blanca, Cajín, Piñonenca, Pulpí, Albar, San Felipe, Tendral, etc.

La variedad más cultivada a nivel nacional, es decir, la variedad Mollar de Elche (*Fotografía 3*), es originaria de Elche, como su nombre indica. La recolección de dicha variedad se inicia en octubre, como se indica en la *Tabla 2*. La variedad Mollar de Elche presenta una forma redondeada, de calibre medio-

grande, con semillas dulces, de piñón y de color rojo claro en el interior. La piel de las granadas de dicha variedad presentan un color rojo-amarillento y es resistente a la manipulación. El contenido en sólidos solubles totales oscila entre 13,44 y 17,68 °Brix. La acidez presenta un valor de 0,24 - 0,35, con un porcentaje en zumo del orden del 34,42 – 40 % y con un contenido medio en fibra bruta de 3,8 - 7,9 % (Cambayas Coop. V., 2018).



*Fotografía 3.* Granadas de la variedad Mollar de Elche.

Por lo referente a la variedad Valenciana, representada en la *Fotografía 4*, cabe destacar su tempranez, puesto que su recolección comienza a finales de agosto, como se puede observar en la *Tabla 2*. En cuanto a las características, dicha variedad posee una forma redondeada, es de calibre medio, con semillas dulces y un piñón inapreciable. El color interno es rosa claro y el externo es un rosa más intenso. Al contrario que la variedad Mollar de Elche, la variedad Valenciana posee una piel sensible a la manipulación. Los sólidos solubles totales presentan valores medios de 13,90 - 15,50 °Brix, con una acidez de 0,14 - 0,26, un porcentaje en zumo del orden del 29,26 - 53,84 % y con un contenido medio en fibra bruta de 8 - 16 % (Cambayas Coop. V., 2018).



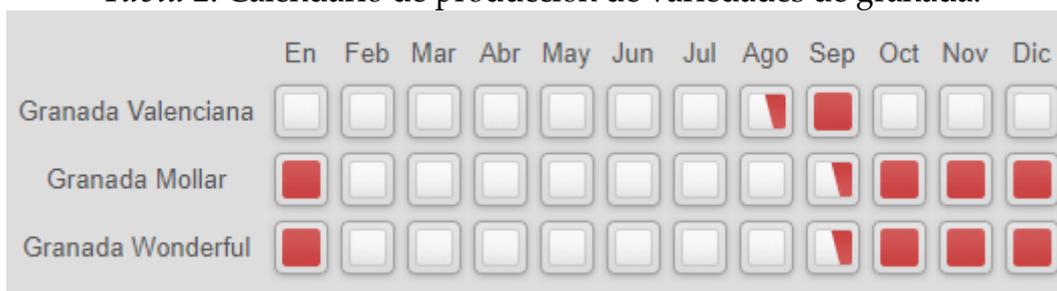
*Fotografía 4.* Granadas de la variedad Valenciana.

A nivel mundial, China, EEUU, Israel, Turquía, Túnez, Marruecos, Irán e India son los principales competidores de España en cuanto a producción de granada. Estos países producen variedades que se caracterizan por tener un sabor más ácido. Entre estas variedades de granada, la más conocida es la variedad Wonderful (*Fotografía 5*), cuya recolección se inicia en octubre (*Tabla 2*). Los frutos de la variedad Wonderful son de calibre medio-grande, y presentan una corona alargada y un color externo rojo. Las semillas son de color rojo intenso, pequeñas, con el piñón semiduro y de sabor ácido. Esta variedad se destina principalmente a la industria, con una productividad media-baja, en general, sin superar los 18.000 Kg / ha.



*Fotografía 5.* Granadas de la variedad Wonderful.

**Tabla 2.** Calendario de producción de variedades de granada.



**Fuente:** Cambayas Coop. V., 2018.

## 1.6. ELICITORES.

Cabe destacar la importancia de la composición de nutrientes de frutas y (carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales), sin embargo, no se debe obviar la importancia de la composición en fitoquímicos. Entre estos, se incluyen los compuestos fenólicos y los glucosinolatos, los cuales favorecen la capacidad de adaptarse al medio e intervienen en los sistemas de defensa de la planta frente a agentes de origen biológico, fúngico y/o viral.

La composición de fitoquímicos depende de:

- Factores genéticos, tales como la familia, especie o variedades.
- Factores fisiológicos, es decir el órgano, el estado de madurez o la edad.
- Factores agronómicos, como sería el fotoperiodo, el estrés salino o la fertilización (Bellostas et al., 2007; Pérez-Balibrea et al., 2008).

Dado los beneficios que aportan los componentes fitoquímicos, se aplican tratamientos con elicitores, que actúan incrementando la producción metabólica de la planta y, por consiguiente, mejorando su composición en fitoquímicos.

Se conocen por elicitores aquellas sustancias que inducen un cambio fisiológico en la planta, a partir del cual se activan una serie de mecanismos similares a las respuestas de defensa que se desencadenan tras la infección de un patógeno o un estímulo del medio, afectando así al metabolismo de la planta y aumentando la síntesis de compuestos fitoquímicos (Baenas et al., 2014). Los elicitores se pueden clasificar como compuestos bióticos o abióticos, aunque las hormonas de las plantas también deben ser consideradas elicitores. Un ejemplo de dichos los elicitores empleados son: ácido oxálico, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, salicilato de metilo y jasmonato de metilo.

Como resultado del gran interés por los componentes fitoquímicos ha surgido numerosas publicaciones dedicadas al estudio de la acción de los elicitores, actuando sólo o en combinación con otros elicitores, para mejorar el contenido fitoquímico de la planta. También resulta relevante determinar el momento idóneo para aplicar el elicitador durante el crecimiento del vegetal. La aplicación de elicitores genera múltiples efectos sobre la planta, siendo destacables un incremento sobre la resistencia sistémica adquirida y/o inducida (Terry y Joyce, 2004) y la estimulación del metabolismo secundario para la síntesis de fitoquímicos (Ruíz-García y Gómez-Plaza, 2013).

### **1.6.1. Ácido oxálico.**

En el presente estudio se determinó el efecto del elicitador ácido oxálico aplicado en pre-cosecha sobre granadas de la variedad Mollar de Elche.

El ácido oxálico, o ácido etanodioico, es un ácido carboxílico cuya fórmula es  $H_2C_2O_4$  (*Imagen 2*). Se trata de un ácido orgánico saturado, que se produce en forma natural como oxalato de calcio o de potasio en raíces y rizomas de muchas plantas.

El ácido oxálico ejerce múltiples funciones fisiológicas en los tejidos de las plantas. El principal efecto que ejerce es un aumento en los mecanismos de defensa enzimáticos y de metabolitos secundarios, como serían los fenoles, que incrementan la resistencia contra hongos, bacterias y virus, como ha sido descrito con anterioridad (Zhu et al., 2016; Razavi y Hajilou, 2016).

En estudios anteriores se ha observado que la aplicación de ácido oxálico en pre-cosecha produjo una reducción en la maduración post-cosecha, retrasando así el ablandamiento de melocotón y kiwi (Zhu et al., 2016; Razavi y Hajilou, 2016).

En conclusión, la aplicación de ácido oxálico, al igual que el resto de los elicitores, al ser componentes naturales sintetizados por las plantas, se puede considerar como una herramienta segura y respetuosa con el medio ambiente.



*Imagen 2.* Estructura del ácido oxálico.

## 1.7. PRODUCCIÓN DE GRANADA E IMPORTANCIA ECONÓMICA.

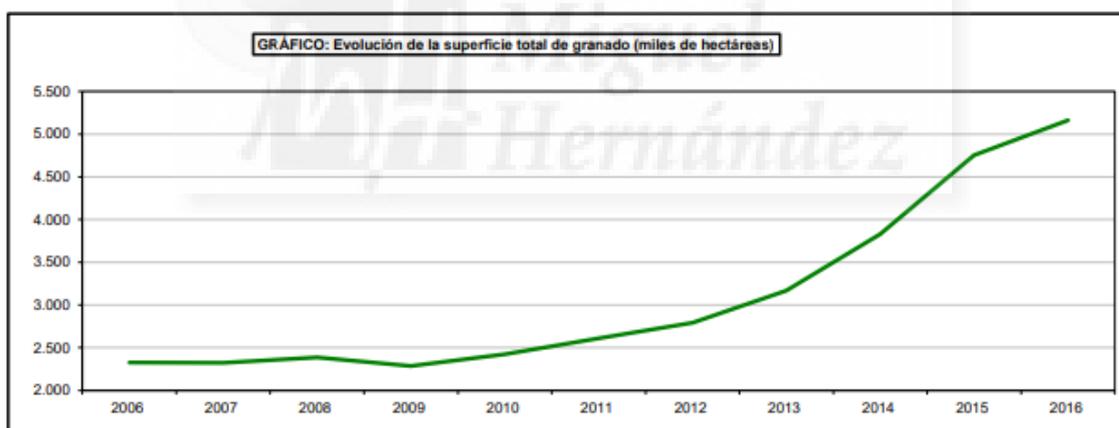
La granada, perteneciente a la especie *Punica granatum*, es propia de climas tropicales y subtropicales, por lo que su cultivo es adecuado en los países de la cuenca Mediterránea, siendo de especial interés su cultivo en España, dado que es el principal país productor y exportador a nivel europeo. España también se sitúa entre los principales productores de granada a nivel mundial, junto con Irán, Israel, India y E.E.U.U. y Turquía.

**Tabla 3.** Datos sobre superficie, producción y el valor del granado.

Años	Superficie en plantación regular		Árboles diseminados (miles de árboles)	Rendimiento de la superficie en producción (qm/ha)	Producción (toneladas)	Precio medio percebido por los agricultores (euros/100kg)	Valor (miles de euros)
	Total (hectáreas)	En producción ( hectáreas)					
2006	2325	2270	43	120.7	27.389	69.30	18.981
2007	2321	2281	37	112.4	25.632	83.01	21.277
2008	2387	2302	27	100.6	23.169	87.95	20.377
2009	2285	2230	20	100.0	22.311	59.59	13.295
2010	2425	2198	23	120.9	26.582	80.20	21.319
2011	2610	2285	15	142.7	32.606	64.17	20.923
2012	2791	2398	12	152.2	36.495	66.27	24.185
2013	3167	2591	13	167.2	43.324	64.95	28.139
2014	3830	2950	6	153.8	45.382	50.75	23.031
2015	4753	3197	6	175.7	56.185	49.09	27.581
2016	5163	3328	6	159.8	53.187	55.96	29.763

Fuente: MAPAMA, 2017.

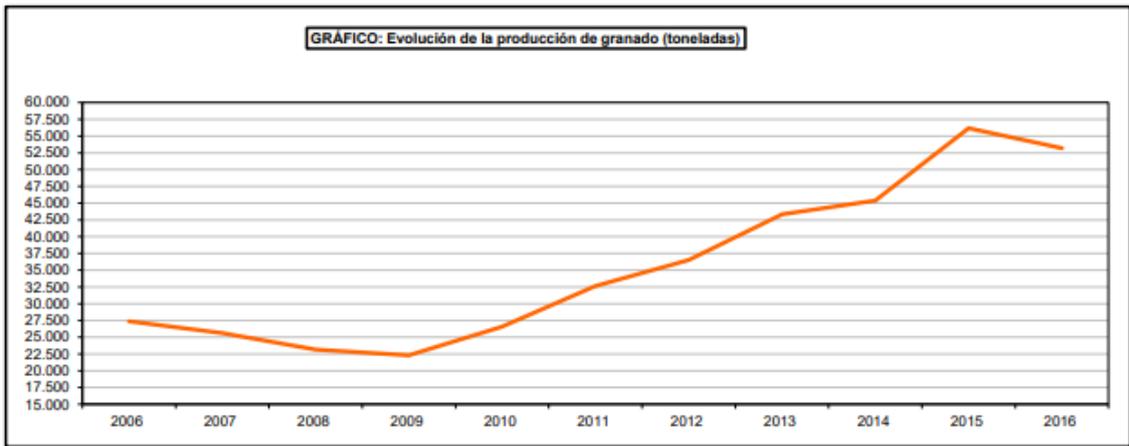
En el *Gráfico 1* se representa la evolución de la superficie total destinada al cultivo de granadas. Como se puede observar, a partir del año 2009 se produce un incremento en la superficie destinada a la producción de este fruto no climatérico, alcanzándose un valor máximo de 5.163 hectáreas (*Tabla 3*) el año 2016.



**Gráfico 1.** Evolución de la superficie total de granado en miles de hectáreas. Fuente: MAPAMA, 2017.

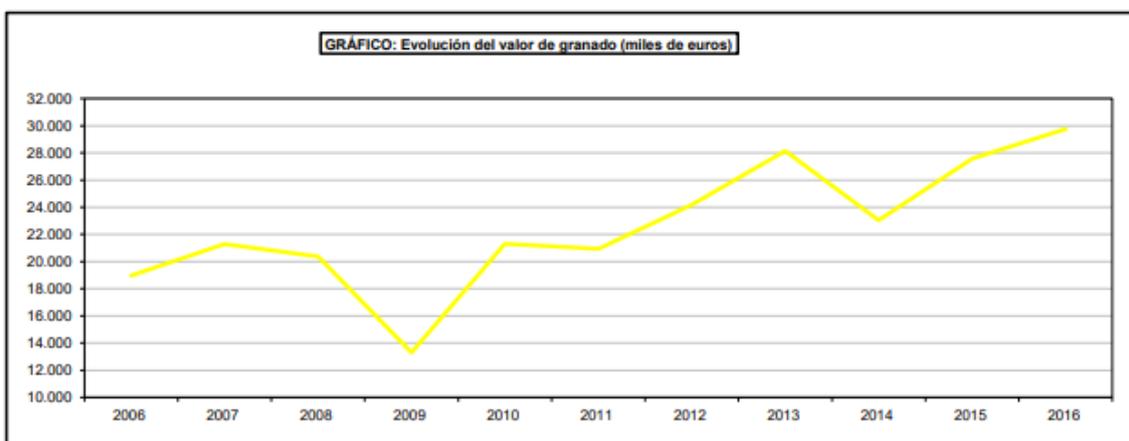
Al observar la evolución de la producción de granadas (*Gráfico 2*), se aprecia un incremento en dicha producción a partir del año 2009. Este incremento en la producción se relaciona con un mayor consumo, a nivel mundial, dado a un mayor conocimiento, por parte de los consumidores, de los efectos beneficiosos del fruto sobre la salud y a su actividad antioxidante. Cabe destacar, sin embargo,

que en el año 2016 la producción se redujo a valores de 53.187 toneladas (*Tabla 3*).



*Gráfico 2.* Evolución de la producción de granado en toneladas. **Fuente:** MAPAMA, 2017.

La evolución del valor de granado viene representada en el *Gráfico 3*, pudiéndose observar que se producen importantes variaciones en el periodo que comprende entre 2006 y 2016. En el año 2009, el granado alcanzó un mínimo valor de 13.295 miles de euros (*Tabla 3*), mientras que, en el año 2016 el valor fue de 29.763 miles de euros, siendo el valor máximo alcanzado en dicho intervalo de tiempo.



*Gráfico 3.* Evolución del valor de granado en miles de euros. **Fuente:** MAPAMA, 2017.

A nivel nacional, la superficie destinada a la plantación de granados es de 5.434 hectáreas (*Tabla 4*), destinándose mayor superficie en la Comunidad Valenciana, en concreto 3.909 hectáreas, de las cuales, 3.188 se encuentran en Alicante. En segundo lugar, se sitúa la Andalucía que destina 667 hectáreas para la plantación de granados, seguida de la Región de Murcia con 387 hectáreas.

Por lo referente a la producción, expresada en toneladas y reflejada en la Tabla 4, la Comunidad Valenciana es la mayor productora de granadas a nivel nacional, con 50.494 toneladas. La Región de Murcia, a pesar de destinar menor superficie a la plantación de granados, es la segunda mayor productora de España, seguida por Andalucía, con valores de 9.421 y 2.628 toneladas, respectivamente. En España, según los datos recopilados en 2017, la producción total alcanza valores de 65.165 toneladas.

**Tabla 4.** Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción.

GRANADO: Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción, 2017

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie en plantación regular (hectáreas)						Arboles diseminados (número)	Rendimiento		Arboles diseminados (kg/árbol)	Producción (toneladas)		
	Total			En producción				Superficie en producción (kg/ha)			En plantación regular	Arboles diseminados	Producción Total
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	Secano		Regadío					
Huesca	1	32	33	-	15	-	4.525	7.800	-	117	-	117	
Zaragoza	-	12	12	-	2	-	4.525	7.343	-	16	-	16	
<b>ARAGÓN</b>	<b>1</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>-</b>	<b>17</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>7.746</b>	<b>-</b>	<b>133</b>	<b>-</b>	<b>133</b>	
Lleida	2	64	66	2	61	-	9.170	16.878	-	1.048	-	1.048	
Tarragona	-	35	35	-	34	-	-	10.000	-	340	-	340	
<b>CATALUÑA</b>	<b>2</b>	<b>99</b>	<b>101</b>	<b>2</b>	<b>95</b>	<b>-</b>	<b>9.170</b>	<b>14.416</b>	<b>-</b>	<b>1.388</b>	<b>-</b>	<b>1.388</b>	
<b>BALEARES</b>	<b>-</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>-</b>	<b>6</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>7.698</b>	<b>-</b>	<b>46</b>	<b>-</b>	<b>46</b>	
Ávila	-	-	-	-	-	48	-	-	-	-	-	-	
Palencia	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	
<b>CASTILLA Y LEÓN</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>53</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>MADRID</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>145</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>13</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	
Toledo	2	5	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>CASTILLA-LA MANCHA</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
Alicante	-	3.188	3.188	-	2.574	1.900	-	18.000	20	46.332	38	46.370	
Castellón	-	55	55	-	27	-	-	12.600	-	340	-	340	
Valencia	-	666	666	-	172	-	-	22.000	-	3.784	-	3.784	
<b>C. VALENCIANA</b>	<b>-</b>	<b>3.909</b>	<b>3.909</b>	<b>-</b>	<b>2.773</b>	<b>1.900</b>	<b>-</b>	<b>18.196</b>	<b>20</b>	<b>50.456</b>	<b>38</b>	<b>50.494</b>	
<b>R. DE MURCIA</b>	<b>-</b>	<b>387</b>	<b>387</b>	<b>-</b>	<b>326</b>	<b>8</b>	<b>-</b>	<b>28.900</b>	<b>10</b>	<b>9.421</b>	<b>-</b>	<b>9.421</b>	
Badajoz	-	230	230	-	28	-	-	13.500	-	378	-	378	
Cáceres	-	46	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>EXTREMADURA</b>	<b>-</b>	<b>276</b>	<b>276</b>	<b>-</b>	<b>28</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>13.500</b>	<b>-</b>	<b>378</b>	<b>-</b>	<b>378</b>	
Almería	-	45	45	-	26	-	-	13.462	-	350	-	350	
Cádiz	3	43	46	3	43	-	-	666	-	46	-	46	
Córdoba	37	31	68	27	21	-	-	1.500	-	156	-	156	
Granada	16	19	35	11	16	2.170	-	4.000	10.938	21	219	46	
Huelva	4	248	252	4	25	-	-	2.000	16.500	-	421	421	
Jaén	4	5	9	4	5	-	-	1.000	3.300	-	21	21	
Málaga	41	62	103	19	58	-	-	1.800	6.900	-	434	434	
Sevilla	10	99	109	6	94	-	-	2.050	9.935	-	935	935	
<b>ANDALUCÍA</b>	<b>115</b>	<b>552</b>	<b>667</b>	<b>74</b>	<b>288</b>	<b>2.170</b>	<b>1.959</b>	<b>8.495</b>	<b>21</b>	<b>2.582</b>	<b>46</b>	<b>2.628</b>	
Las Palmas	-	-	-	-	-	1.820	-	-	2	-	4	4	
S.C. de Tenerife	1	34	35	1	34	745	-	19.995	2	670	1	671	
<b>CANARIAS</b>	<b>1</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>1</b>	<b>34</b>	<b>2.565</b>	<b>-</b>	<b>19.995</b>	<b>2</b>	<b>670</b>	<b>5</b>	<b>675</b>	
<b>ESPAÑA</b>	<b>121</b>	<b>5.313</b>	<b>5.434</b>	<b>77</b>	<b>3.567</b>	<b>6.841</b>	<b>2.121</b>	<b>18.203</b>	<b>13</b>	<b>65.074</b>	<b>91</b>	<b>65.165</b>	

Fuente: MAPAMA, 2017.

## 2. OBJETIVOS

La granada (*Punica granatum* L.) está considerada como una de las frutas comestibles más antiguas, la cual, se cultiva de forma extensiva en poblaciones del Mediterráneo, incluyendo a España, generalmente se consume en fresco (granos) o en zumo. Los frutos son recolectados normalmente cuando están completamente maduros, puesto que son frutos no climatéricos y muestran una tasa de respiración baja (Ben-Arie et al.,1984), poseen un brillo ceroso y un color que va desde el rojizo al rojo dependiendo de la variedad.

Recientemente ha recibido una atención considerable la aplicación de compuestos naturales y ecológicos como tratamientos pre-cosecha. Estos compuestos han sido evaluados para estudiar su capacidad a la hora de retrasar la maduración y la senescencia así como preservar la calidad de frutas y verduras. Uno de estos compuestos naturales recientemente evaluados es el ácido oxálico (AO), que se ha demostrado que retarda el proceso de maduración post-cosecha y mantiene tanto la calidad como las propiedades funcionales.

No obstante, los tratamientos post-cosecha tienen restricciones legales cada vez mayores en muchos países de todo el mundo, incluso si se usan compuestos naturales que se presentan en las plantas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de ácido oxálico (OA) durante el desarrollo de las granadas en el árbol, y su efecto sobre la producción general de estos frutos para lo que se evaluó:

- Producciones totales.
- Número de frutos por árbol.
- Peso de los frutos.

Además también se han evaluado los parámetros de calidad de las granadas tanto en el momento de la cosecha como durante su posterior almacenamiento en post-cosecha. Para ello evaluamos los siguientes parámetros:

- Tasa de respiración.
- Pérdida de peso.
- Firmeza.
- Color externo e interno.
- Determinación de los sólidos solubles.
- Determinación de la acidez total.
- Determinación de las antocianinas totales.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

El fruto utilizado para realizar este trabajo ha sido la granada *Punica granatum* L. de la variedad Mollar de Elche.

Las granadas de este experimento provienen de una finca situada en el campo de Elche propiedad de la cooperativa 'Cambayas'.

Tras la recolección, los frutos fueron transportados al laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (E.P.S.O.), perteneciente a la Universidad Miguel Hernández de Elche.

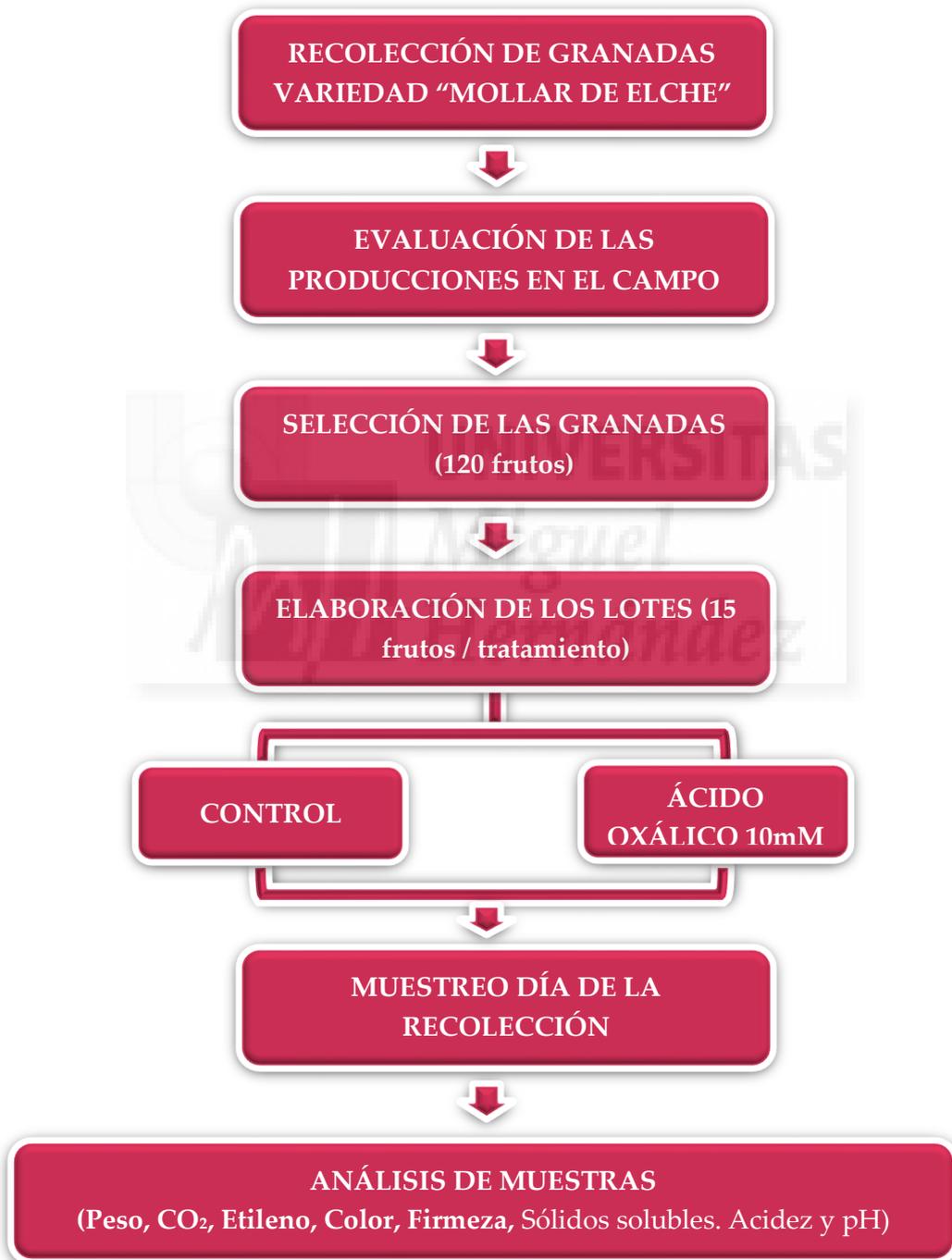
#### 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental de este Trabajo Fin de Grado comenzó con el tratamiento tras la floración del granado con ácido oxálico 10mM. Tras este primer tratamiento, todos los árboles se volvieron a tratar en un total de cinco ocasiones espaciadas en el tiempo cada treinta días. Posteriormente, se llevó a cabo la recolección de los frutos el día 04 de Octubre 2017, día en el que fueron llevados al laboratorio y donde se seleccionaron las que no presentaban ningún tipo de daño. Posteriormente y con el objeto de evaluar las producciones totales, el día 24 de Octubre se recolectaron el resto de granadas no recogidas en la primera fecha de recolección.

De entre todas las granadas recolectadas, fueron seleccionadas 60 de cada tratamiento que no presentaban daños. Como se explica en el *Diagrama 1*, los frutos se separaron en lotes de 15 frutos para cada tratamiento, es decir, para los frutos control y para los tratados con ácido oxálico 10mM.

Las primeras determinaciones que realizamos fueron las no destructivas, como son el peso de las granadas, el color, la firmeza y la tasa de respiración. A

continuación, se partían las granadas en dos obteniendo muestras homogéneas de 10 mitades por repetición y tratamiento. Una de ellas se utilizó para obtener dos zumos que eran, a su vez, analizados por duplicado para obtener el contenido en sólidos solubles y acidez. El zumo de las granadas se recogió en un tubo eppendorf para la evaluación del contenido en antocianinas totales.



*Diagrama 1:* Diseño experimental en las granadas de la variedad Mollar.

### 3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

#### 3.3.1. Pérdida de peso.

Se pesaron todos los lotes en los días de muestreo y se anotó el valor obtenido. La determinación del peso se realizó mediante una balanza marca Mettler modelo PB1502 con 2 cifras decimales de precisión  $\pm 0,01$ . El peso fue expresado en gramos. Se pesaron individualmente las granadas de cada lote y los resultados representan la media  $\pm$  ES.

#### 3.3.2. Determinación de CO<sub>2</sub>.

Durante la respiración, todo tejido vegetal consume O<sub>2</sub> y libera CO<sub>2</sub>. El metabolismo del fruto está íntimamente ligado con la actividad respiratoria. La medida de la respiración se refiere tanto a la producción de CO<sub>2</sub> como al consumo de O<sub>2</sub>. Sin embargo, normalmente se mide la producción de CO<sub>2</sub> por ser un procedimiento más sencillo. La medida de la actividad respiratoria se puede realizar por un sistema estático o cerrado, o por un sistema dinámico, de flujo o abierto. En nuestro experimento se optó por un sistema estático.

Utilizamos el sistema propuesto por Kader (1992). Este sistema implica encerrar el producto en un recipiente herméticamente cerrado por un período de tiempo determinado. El gas producido como consecuencia de la respiración se acumula con el tiempo en el interior del recipiente. La cantidad de gas producido puede determinarse conociendo el peso del producto, el volumen del recipiente y la concentración del gas después de un determinado período de tiempo.

$$\frac{mg.CO_2}{kg \times h} = \frac{(V - P) \times (26400 \times \text{área}CO_2)}{22,4 \times P \times T}$$

Donde:

V = volumen del recipiente (ml).

P = peso de la muestra (g).

Área CO<sub>2</sub> = área obtenida en el cromatógrafo.

T = tiempo que ha permanecido cerrado el recipiente (min).

Para la determinación de etileno y CO<sub>2</sub> en sistema estático se introdujeron los frutos enteros por lotes en tarros de plástico de 4 litros de capacidad, con cierre hermético y una tapadera que tenía una válvula de material elastómero que permitió realizar las inyecciones.

Los frutos permanecieron en los tarros cerrados durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedió a extraer el aire del espacio de cabeza del interior del recipiente. Se extrajeron 5 jeringuillas con un volumen de 1 mL cada una, de cada uno de los recipientes.

Para determinar el CO<sub>2</sub>, se inyectó el contenido de las jeringuillas en un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 14 A) siguiendo unas determinadas condiciones de trabajo, que son las siguientes:

- Temperatura del horno: 50 °C.
- Temperatura del inyector: 115 °C.
- Temperatura del detector: 115 °C.
- Flujo del gas portador (Helio): 16 mL / mm.
- Patrón utilizado: aire atmosférico (0,036 %).

El pico de CO<sub>2</sub> se detecta por su tiempo de retención, que en estas condiciones de trabajo se encuentra entre 1,4 y 1,6 minutos. La concentración de CO<sub>2</sub> en las muestras tomadas en los botes, se calcula comparando el área de integración del pico de la muestra con la de un patrón de CO<sub>2</sub> de concentración conocida, que en este experimento fue la presente en la atmosfera, de 0,036 %.

Los resultados se expresaron en mg de CO<sub>2</sub> desprendido por kg de fruta y hora (mg CO<sub>2</sub> × kg<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup>).

### 3.3.3. Evaluación del color.

El color se determinó utilizando el sistema CieLab (L\*, a\*, b\*) mediante un colorímetro triestímulo Minolta modelo CR200. Se realizaron tres medidas del color para cada fruto en tres puntos equidistantes de la zona ecuatorial.

Este sistema de medida es el más ampliamente conocido puesto que permite aproximarse a la percepción humana del color. Estas coordenadas están relacionadas con tres índices básicos que se pueden distinguir en cualquier apreciación del color: luminosidad y cromaticidad.

Estos tres parámetros son:

- L\*. Indica la luminosidad del fruto y varía de 0 (negro) a 100 (blanco).
- a\* y b\*. Indican conjuntamente la cromaticidad, a\* representa el eje que va desde colores verdes (-a\*) hasta colores rojos (+a\*); y b\* representa el eje que va desde el color azul (-b\*) hasta color amarillo (+b\*).



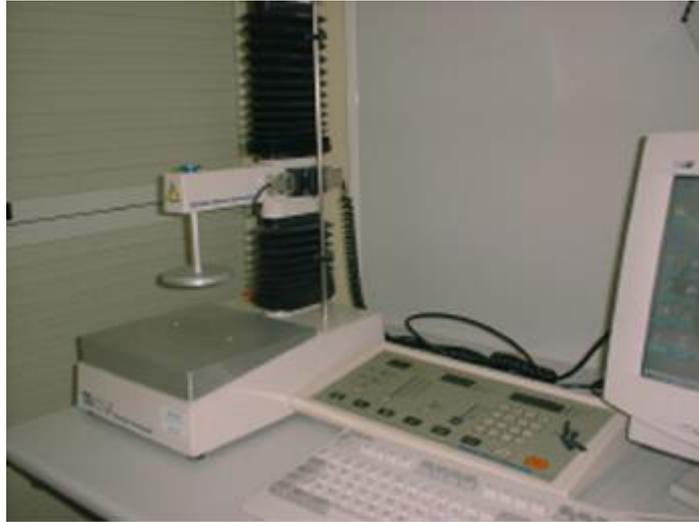
*Fotografía 7:* Colorímetro utilizado para medir el color.

Cada color viene dado por los valores de estas tres coordenadas, que representan un punto en el espacio tridimensional (Minolta, 1994). Los resultados se expresaron como  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y el ángulo de Hue ( $H^* = \arctg b^*/a^*$ ).

#### **3.3.4. Determinación de la firmeza.**

Para la determinación de la firmeza del fruto entero, se utilizó un texturómetro TA-XT2i® (Anname Instruments), que está conectado a un ordenador para procesar los datos.

La velocidad de descenso del disco fue de  $20 \text{ mm min}^{-1}$ , hasta alcanzar una deformación del 10 %. Los resultados se expresaron como la relación existente entre la fuerza necesaria para conseguir la deformación anteriormente citada y la distancia de dicha deformación en  $\text{N mm}^{-1}$ .



*Fotografía 8:* Texturómetro utilizado para medir la firmeza de los frutos.

### **3.3.5. Evaluación de los sólidos solubles.**

Para la determinación del contenido total en sólidos solubles (SST) se utilizó la refractometría sobre el zumo filtrado extraído de cada lote de cinco granadas. Esta técnica se basa en la diferencia que existe entre los índices de refracción del agua destilada y un medio de concentración determinada de sustancias disueltas. Este método no establece estrictamente el nivel de azúcares, sino la concentración de sólidos solubles, la cual se relaciona con el nivel de azúcares y con el estado de madurez de los frutos.

Antes de realizar la determinación de los sólidos solubles se llevó a cabo la preparación de las muestras. Para ello se cortaron por la mitad las cinco granadas de cada uno de los lotes a analizar, se separaron los arilos de la corteza y estos se envolvieron en una tela de algodón para exprimirlos con la ayuda de un mortero. Así se extrajo el zumo de los frutos y se realizaron dos medidas de cada cinco frutos.

Para realizar la determinación de los sólidos solubles se midieron los °Brix colocando unas gotas en un refractómetro Warszawa modelo RL2, con una

sensibilidad de  $\pm 0,2$  °Brix. El refractómetro se calibra con agua destilada, y las medidas se realizaron a 20 °C.



*Fotografía 9:* Refractómetro utilizado para medir los °Brix (SST).

### 3.3.6. Determinación del pH y de la acidez titulable.

Para determinar la acidez de los frutos se utilizó 1 mL del zumo extraído tras exprimir los arilos de las granadas y se disolvió en 25 mL de agua destilada. Para llevar a cabo el análisis se utilizó un valorador automático Metrohm, modelo 785DMP Tritino, complementado con un cambiador de 24 posiciones modelo 760 y con una impresora modelo DP40 - 24N. Así se obtiene el pH inicial y se realiza la valoración hasta un pH final de 8,1 con NaOH 0,1 N. Los resultados se expresaron en mg equivalentes del ácido orgánico mayoritario.

$$\text{Gramos de ácido málico /100 mL} = 6,7 * V_1 * f * N / P$$

Donde:

N = Normalidad del NaOH.

V<sub>1</sub> = volumen de NaOH 0,1 N utilizado en la valoración.

F = Factor del NaOH.

P = Peso de la muestra (g).

El resultado final se expresó en: media  $\pm$  ES.



*Fotografía 10:* Valorador automático Methrom, utilizado para determinar la acidez.

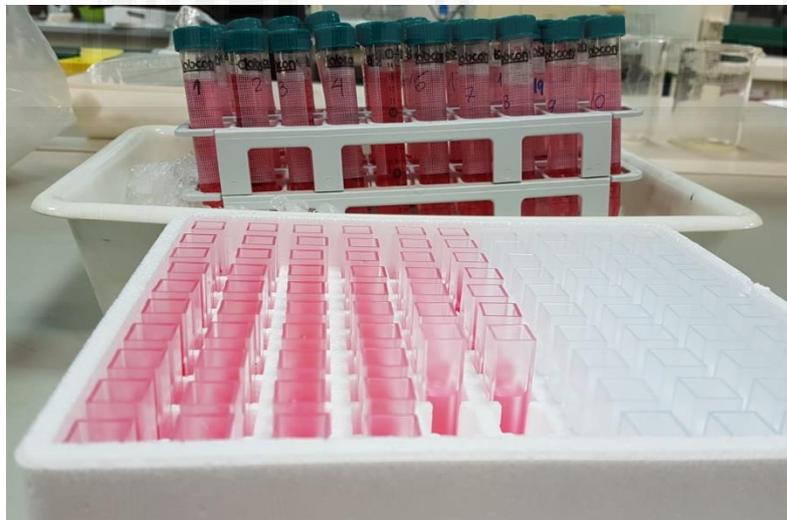
### 3.3.7. Determinación de las antocianinas totales.

Para cuantificar las antocianinas totales por espectrofotometría, el análisis funcional se dividió en dos fases. Una primera fase de extracción de los compuestos y otra segunda fase de determinación de los mismos. El proceso de extracción se detalla a continuación:

1. Se tomó una cantidad de zumo (2 mL) de la mezcla de 5 granadas que conformaban una repetición, a la cual se le adicionó un volumen de extractante (8 mL). El extractante era Metanol/Agua en una proporción 80:20 + Fluoruro de sodio (FNa) diluido en un 1 % de ácido clorhídrico (HCl). El FNa actúa como agente antipardeante tras la rotura de las células del vegetal y la consecuente liberación de las enzimas de la vacuola

durante el paso siguiente y el ácido (normalmente, sirve cualquier ácido) permite la estabilización de los antocianos en el medio.

2. Posteriormente, se homogeneizó en el desintegrador de tejido vegetal Polytron® modelo PT3100 durante 60 segundos a 24000 r.p.m. y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 r.p.m. a una temperatura de 4 °C en una centrífuga modelo C30P CENTRIFUGE, B. Braun. Biotech. Antes de centrifugar, se calibraron los tubos de centrífuga con el medio extractante haciendo uso de una pipeta de pasteur.
3. Una vez obtenido el extracto centrifugado, se medía en una probeta de vidrio el volumen de extracto obtenido para utilizarlo posteriormente en los cálculos del contenido total de antocianos. Posteriormente, se pasaba dicho volumen medido a un tubo Falcon™ de 15 mL rotulado con un número de muestra determinado y tapado con rosca (*Fotografía 11*).

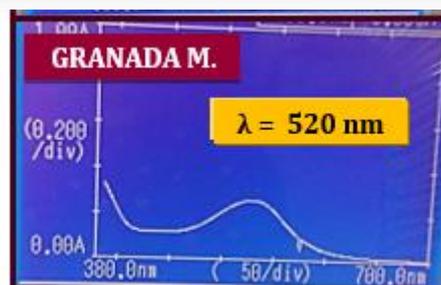


**Fotografía 11:** Muestras extraídas de antocianinas totales para su medición.

Una vez acabado el proceso de extracción de las muestras y obtenidos los extractos, se determinaron los antocianos totales. La medición de dichos se realizó por espectrofotometría, pero puesto que diferentes fuentes bibliográficas

citan distintas longitudes de ondas para la medición de dichos compuestos sin existir un consorcio en dicho tema y puesto que cada fruto presenta una antocianina predominante que lo caracteriza, para asegurarnos de estar midiendo lo que nos interesa, en primer lugar, se realizó con el espectrofotómetro, modelo Uvikon XS Bio-Tek Instruments, la determinación del espectro de absorción máxima para las muestras. El objetivo era determinar la longitud de onda ( $\lambda$ ), en nm, a la que los extractos de granada presentan la máxima absorción.

Dicho espectro es como la huella dactilar del compuesto estudiado y, con ello, nos aseguramos de medir en el rango de longitud de onda correcto. De forma que el espectro de absorción para la medición de antocianos de granada es el mostrado en la *Fotografía 12*. Una vez conocido este, se realiza la medida a la longitud de onda determinada en el espectro. Para ello, se diluía cada muestra con el extractante, utilizado para hacer el blanco en el espectrofotómetro, con el fin de obtener una absorbancia comprendida entre 0 y 1, cumpliendo la Ley de Lambert-Beer.



*Fotografía 12:* Espectro de absorción máxima para las antocianinas totales en granada.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de antocianinas totales en los tratamientos se han obtenido a partir de la siguiente fórmula, teniendo en cuenta la absorbancia medida, el volumen de extracto, el factor de dilución (FD 1:4), el volumen de la muestra y el coeficiente de extinción molar (que en todos

los casos es de 23.900), expresándolos como miligramos por cada 100 g de peso fresco y siendo la media  $\pm$  ES.

$$\text{Concentración Antocianinas} = \frac{\text{ABS} \times (\text{Vol.Extracto} \times \text{Factor Dilución}) \times 449 \times 1000}{\text{Vol.Muestra} \times \text{Coeficiente Extinción Molar}}$$

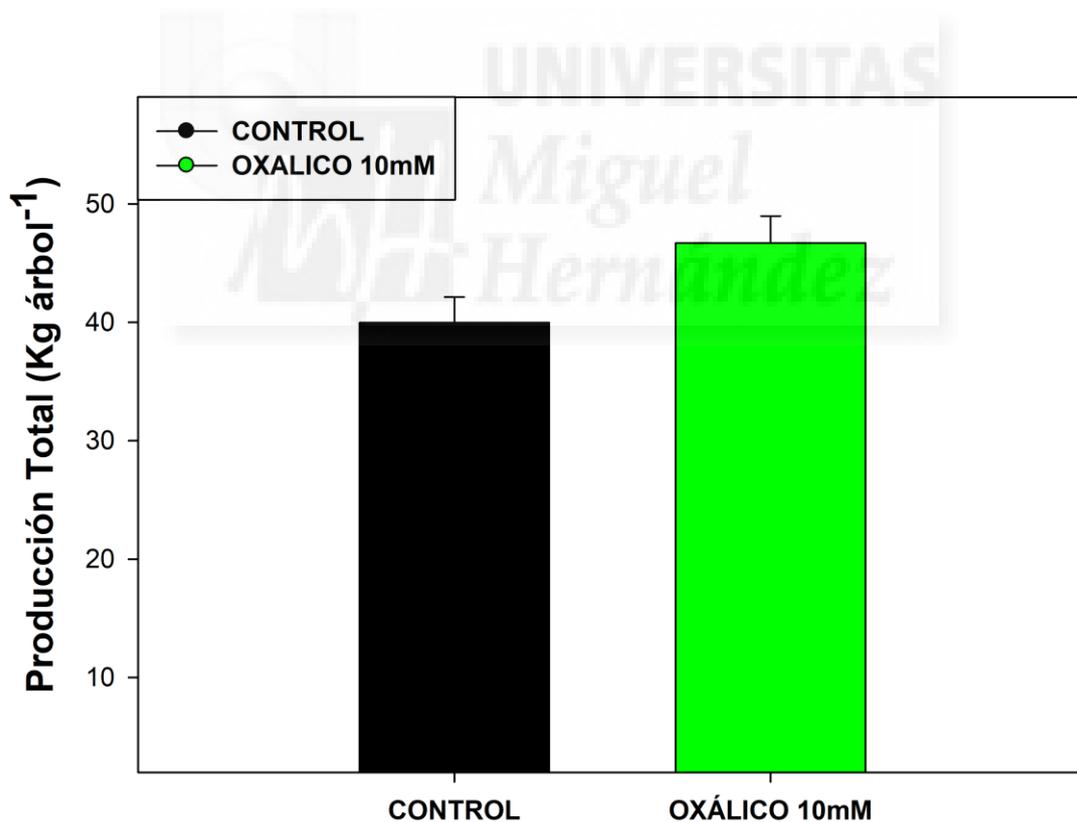
(mg · 100 g<sup>-1</sup>)



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

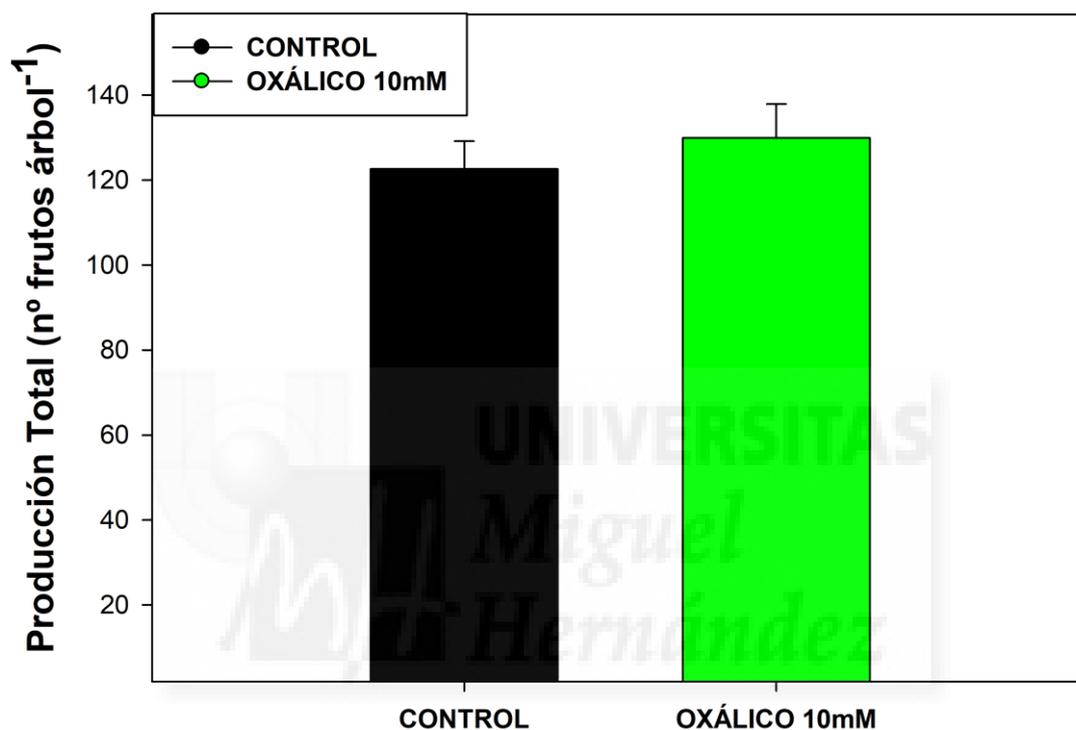
### 4.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO OXÁLICO EN PRE-COSECHA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE GRANADA.

Tras analizar los resultados de las producciones totales de los granados tratados con ácido oxálico en pre-cosecha y controles, observamos que el tratamiento tuvo un efecto positivo sobre este parámetro (*Figura 2*). De hecho, los granados tratados con ácido oxálico mostraron mayores niveles de producción que los árboles controles, ya que se obtuvieron unas producciones de  $46,70 \pm 2,27$  y  $39,16 \pm 2,17$  (Kg árbol<sup>-1</sup>) para los árboles tratados con ácido oxálico y controles, respectivamente.



*Figura 2.* Producción total tras la recolección de granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles.

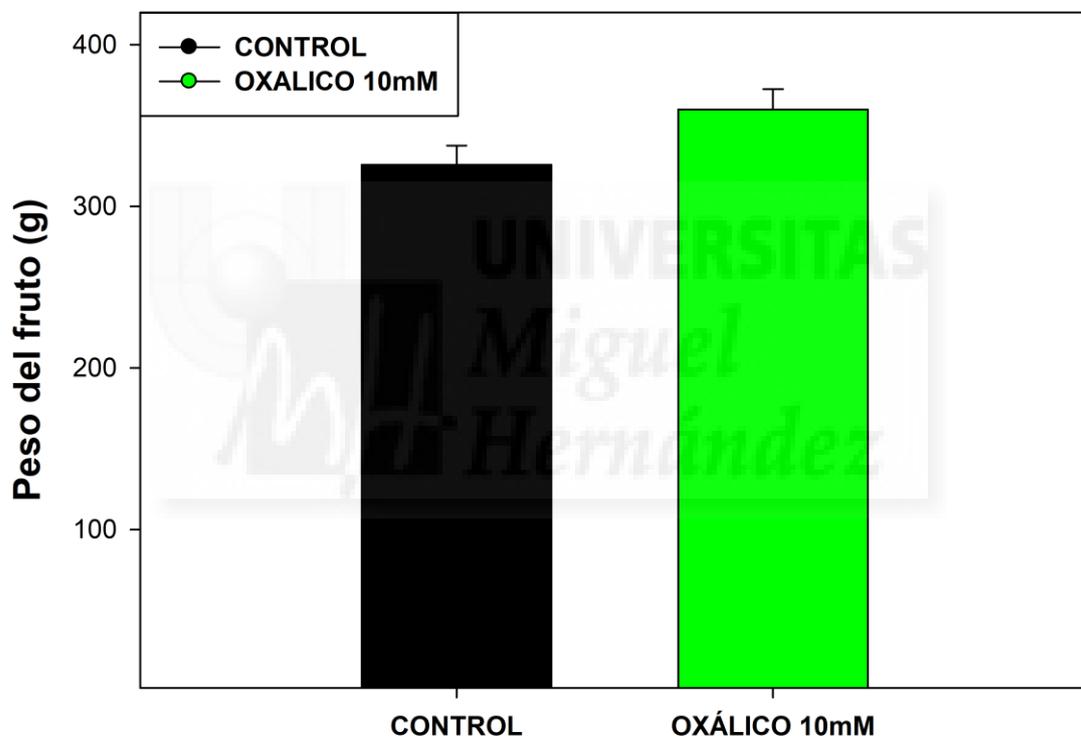
Con respecto al número de frutos obtenidos por granado, podemos observar en la *Figura 3*, como los árboles tratados produjeron un mayor número de frutos ( $129,90 \pm 7,99$  Kg árbol<sup>-1</sup>) en comparación con los árboles control ( $122,60 \pm 6,57$  Kg árbol<sup>-1</sup>). De modo que, el elicitor tuvo un efecto positivo sobre el número de granadas por árbol.



*Figura 3.* Producción total, en número de frutos por árbol, tras la recolección de granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles.

Asimismo, el ácido oxálico también ejerce un efecto positivo desde el punto de vista del peso medio de los frutos, tal y como se puede apreciar en la *Figura 4*. De este modo, los frutos pertenecientes a los árboles tratados con ácido oxálico 10mM presentaron un peso medio significativamente mayor, con un valor medio de  $359,87 \pm 12,61$  gramos por granada.

Teniendo en cuenta todos los datos de producción, se pudo observar que el rendimiento de los cultivos aumentó significativamente con el tratamiento con ácido oxálico. Este efecto pudo deberse a un aumento en el peso de las granadas principalmente. Existe muy poca información disponible sobre el efecto del AO en pre-cosecha sobre el desarrollo y maduración en el árbol pero Martínez-Esplá et al., (2014) obtuvieron resultados similares al tratar con ácido oxálico en pre-cosecha dos variedades diferentes de cereza.



*Figura 4.* Peso de los frutos tras la recolección de granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles.

#### **4.2. EVOLUCIÓN DE LA RESPIRACIÓN Y LA PÉRDIDA DE PESO DE LAS GRANADAS TRATADAS CON ÁCIDO OXÁLICO Y CONTROLES DURANTE DISTINTOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO.**

Las frutas y hortalizas siguen respirando tras la recolección, a pesar de que la actividad fotosintética se interrumpa. Con el fin de obtener energía, los azúcares provenientes de la degradación del almidón se oxidan, generando a su vez agua y CO<sub>2</sub>. La respiración consiste en una serie de reacciones catalizadas por enzimas, cuya velocidad está directamente relacionada con la temperatura. Por consiguiente, un aumento en la temperatura del fruto, producido por las reacciones necesarias para la respiración, estimulará aún más el proceso de respiración, de modo que se vuelve muy difícil controlar la temperatura del fruto (Barba-Teodoro, 2015).

La velocidad de respiración es característica a los diferentes productos hortofrutícolas y está relacionada con la vida comercial del producto. Una actividad respiratoria elevada conlleva a una menor vida útil del producto hortofrutícola, debido a que el producto presenta una actividad metabólica elevada, y ello conlleva a un período de almacenamiento menor (Gil, 2010).

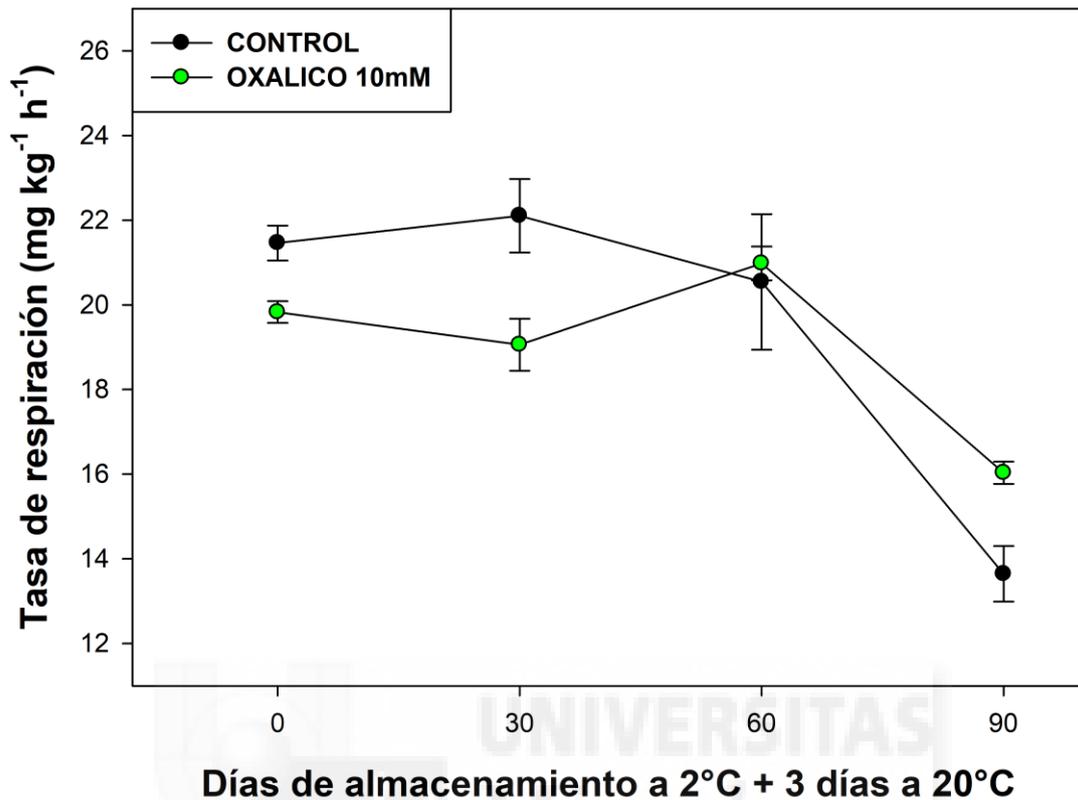
En el caso de las granadas, al ser frutos no climatéricos, tras la recolección, no se produce aumento en la tasa de respiración ni aumento en la producción de etileno durante el proceso de maduración y se considera que la maduración de estos frutos es independiente del etileno (Abeles et al., 1992; Lelièvre et al., 1997; Giovannoni, 2001).

Los resultados que se muestran a continuación hacen referencia a los datos obtenidos tras un almacenamiento a 2 °C, más tres días a 20 °C (condiciones "Shelf Life") durante el tiempo de almacenamiento que se muestra en el eje de abscisas (0, 30, 60 y 90 días).

En la *Figura 5* se refleja el efecto del elicitador sobre la tasa de respiración de los frutos, expresada como mg de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Como se puede observar, las granadas tratadas con ácido oxálico presentaron menor tasa de respiración inicial en comparación con los frutos controles. De hecho es fácil observar un retraso general en la tasa de respiración de los frutos tratados con ácido oxálico 10mM con respecto a los frutos controles.

Tras los 60 días de almacenamiento, en ambos tratamientos, se produce una reducción de la tasa de respiración, alcanzándose valores de 16,03 ± 0,26 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en los frutos tratados y 13,65 ± 0,66 a los 90 días de almacenamiento.

En estudios previos se ha podido observar que el ácido oxálico actúa reduciendo la tasa de respiración, lo que se puede relacionar con una disminución de la actividad metabólica de las células durante el desarrollo del fruto en la planta, y esto puede presentar relación con una reducción del proceso de senescencia durante el almacenamiento (Sayyari et al., 2010; Valero et al., 2011; Huang et al., 2013).



*Figura 5.* Tasa de respiración de las granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

Con respecto a las pérdidas de peso, es conocido que tras la recolección, continúan los procesos de transpiración del fruto, siendo este un proceso físico por el cual el agua, en estado de vapor, puede atravesar estomas y la epidermis de manera que conducen a la pérdida de peso del fruto (Valero y Serrano, 2010).

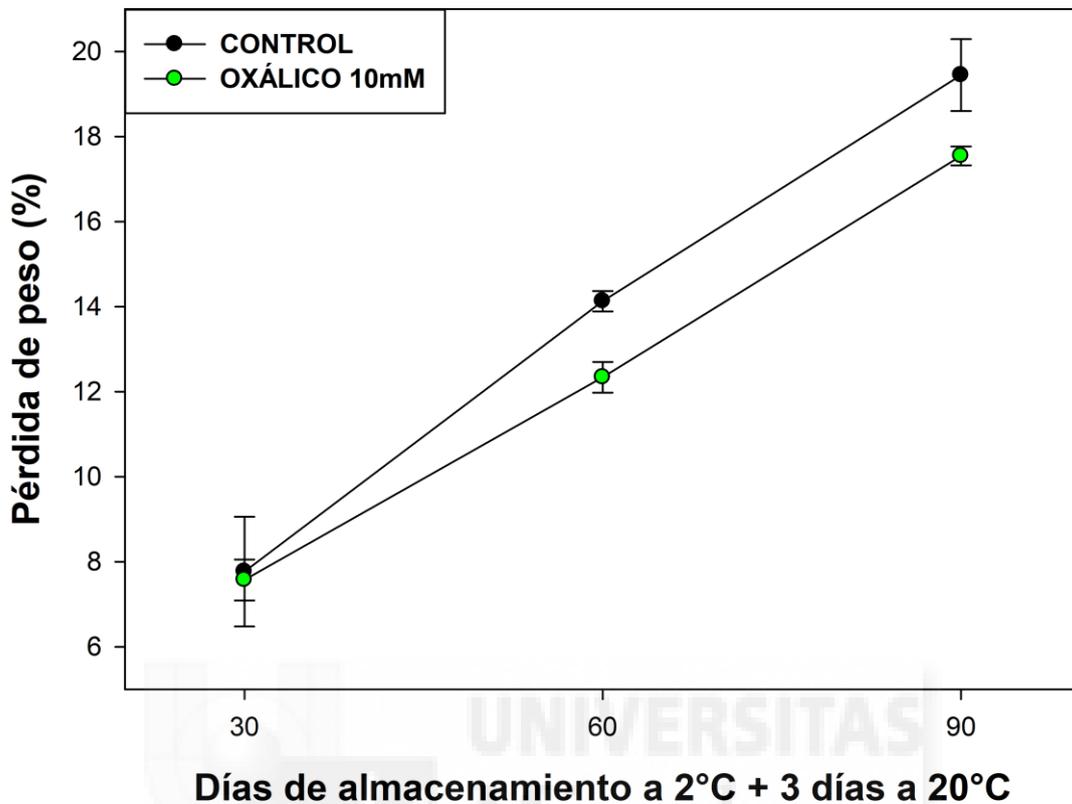
La pérdida de agua se muestra de forma directa como una reducción del peso del producto, afectando también a otras propiedades del fruto, tales como un aspecto deshidratado o reducción de la turgencia, lo que conlleva a una mayor susceptibilidad al ataque de microorganismos.

De este modo, resulta relevante el control de la velocidad de la transpiración, ya que influye inversamente en la vida útil del producto. Dicha velocidad, se ve influenciada por varios factores externos, tales como la temperatura, que presenta una relación directa con la transpiración, o la humedad relativa, que presenta una relación inversa.

La aplicación de ácido oxálico ejerce un efecto positivo sobre la transpiración del fruto, reduciéndola. Ello se manifiesta en una menor pérdida de peso, tal y como se ve reflejado en la *Figura 6*. Teniendo en cuenta que a los treinta días de almacenamiento las pérdidas de peso (%) de los controles y de los frutos tratados presentaban valores de  $7,77 \pm 1,29$  y  $7,57 \pm 0,49$ , respectivamente, cabe destacar que, tras noventa días de almacenamiento a  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y tres días a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la pérdida de peso experimentada por los controles es de  $19,44 \pm 0,85$ , mientras que las muestras tratadas con el elicitador presentan pérdidas con valores de  $17,54 \pm 0,22$ . Por lo que se observa el efecto positivo del ácido oxálico sobre el parámetro en cuestión.

En estudios anteriores se observó que cuanto menor era la humedad relativa, mayores pérdidas de peso se producían durante el almacenamiento. (Escriche et al., 1992).

Por otra parte, cabe destacar que, muestras tratadas con ácido oxálico presentaron pérdidas de peso significativamente más bajas en comparación los controles en el caso de alcachofa (Martinez Esplá et al., 2017).



*Figura 6.* Pérdida de peso de las granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

#### 4.3. EVOLUCIÓN DEL COLOR DE LAS GRANADAS TRATADAS CON ÁCIDO OXÁLICO Y CONTROLES DURANTE DISTINTOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO.

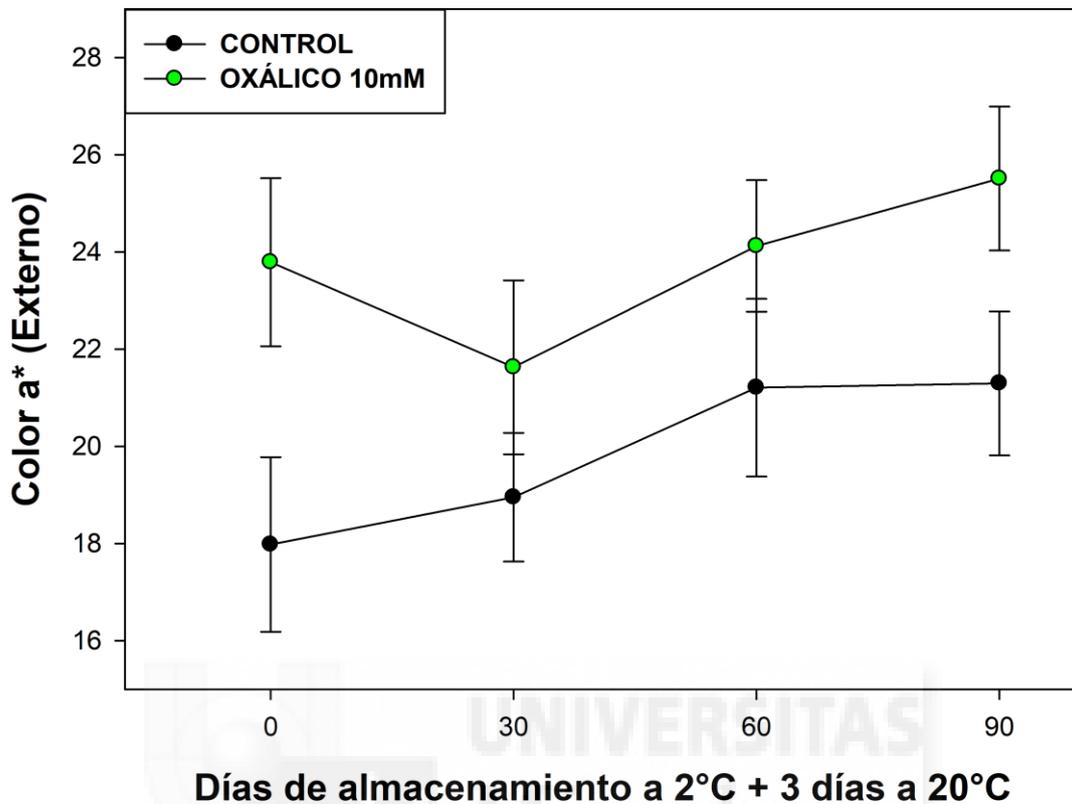
Desde el punto de vista de los consumidores, el color de una fruta u hortaliza es uno de los parámetros que más influencia ejerce sobre su aceptación. El color de los productos vegetales es debido a la presencia de pigmentos, tales como clorofila, carotenoides, flavonoides o betalaína. El color también se puede ver relacionado con la vida útil del producto, ya que ésta será menor cuanto mayor sea el grado de oscurecimiento del mismo (Crisosto et al., 1997).

#### 4.3.1. Efecto sobre el color externo de las granadas.

A continuación, se analizará la evolución del color externo de granadas a las que se les ha aplicado ácido oxálico 10mM en pre-cosecha y que han sido almacenadas a 2 °C durante noventa días, más tres días a 20 °C, con el fin de imitar las condiciones "Shelf Life". Las granadas tratadas se compararán con controles, para determinar el efecto del ácido oxálico 10mM.

En primer lugar, se determinó la evolución del parámetro  $a^*$  del sistema CIELab, dado que este permite evaluar las tonalidades rojizas, representando la variación de colores rojo-verde. En concreto, resulta de interés que dicho parámetro tenga un valor positivo, puesto que corresponde con el color rojo.

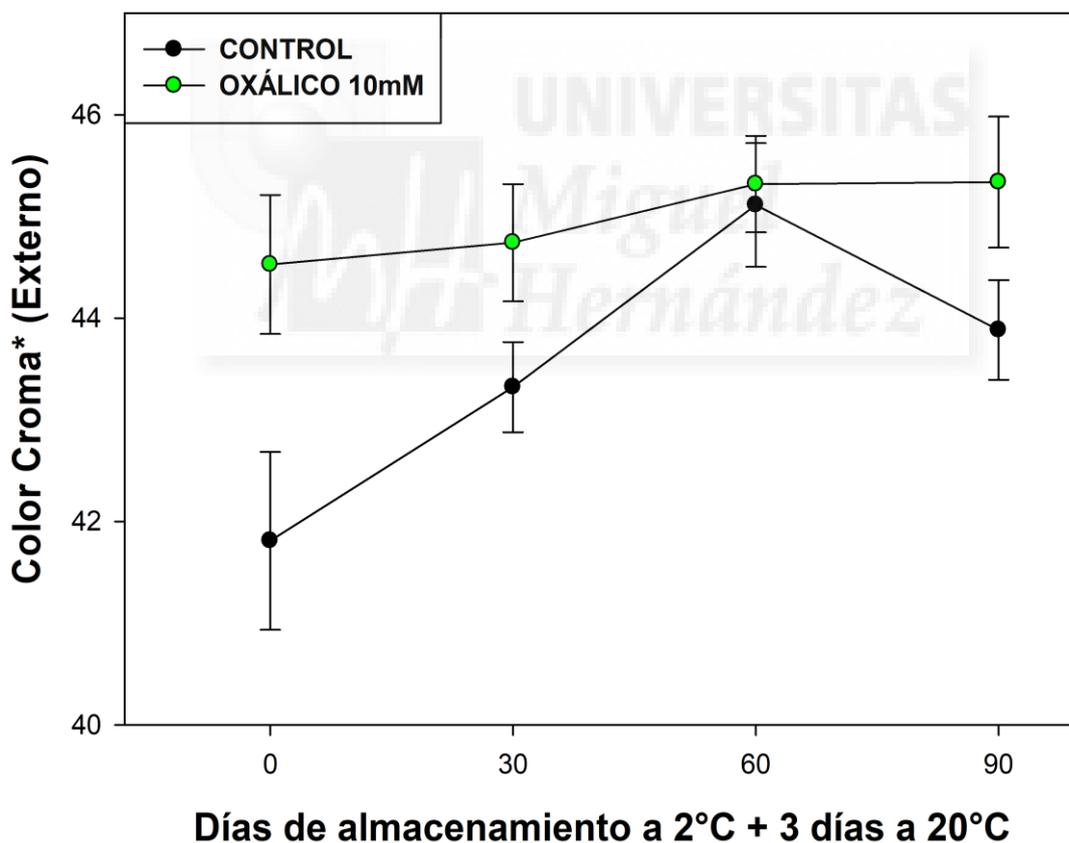
El efecto del ácido oxálico sobre el exterior de las granadas se puede ver reflejado en la *Figura 7*. Dicho elicitor mostró resultados positivos, puesto que las granadas tratadas poseen una piel con mayor tonalidad rojiza que los frutos control inclusive en el día cero. Los valores correspondientes al día cero son  $17,98 \pm 1,79$  para los controles, y  $23,79 \pm 1,73$  para las granadas tratadas, alcanzándose valores de  $25,51 \pm 1,48$  en las muestras tratadas, tras los noventa días de almacenamiento, que fueron superiores a las muestras control.



*Figura 7.* Evolución del color a\* de la corteza de las granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

Otro parámetro en relación a la piel que se analizó es el color Croma\*, obtenido a partir de los parámetros a\* y b\*, y que proporciona información sobre la saturación del color. La evolución de dicho parámetro viene reflejado en la *Figura 8*, según la cual se puede observar que las granadas tratadas presentan mayores valores del parámetro en cuestión, con valores de  $44,53 \pm 0,68$  al día cero, y de  $45,34 \pm 0,64$  tras noventa días de almacenamiento a 2 °C y tres días a 20 °C. En contraposición, las granadas control presentan valores de  $43,88 \pm 0,49$  tras los noventa días de almacenamiento, partiendo de valores de  $41,81 \pm 0,87$  en el día de la cosecha.

En otro estudio, realizado en alcachofa, se pudo observar que, en las muestras control, se producía un descenso en el color croma\* tras tres días de almacenamiento a 20 °C, produciéndose también una senescencia más acelerada, como resultado de la conservación post-cosecha. Sin embargo, el ácido oxálico aplicado a las alcachofas tratadas ejerció un efecto positivo, sin que se presentaran cambios en las mismas con respecto a este parámetro (Ruíz-Jiménez et al., 2014). Por otra parte, en otro estudio realizado en alcachofa se pudo observar que la aplicación de ácido oxálico en pre-cosecha derivó en una reducción del color croma\* (Martinez-Esplá et al., 2017).



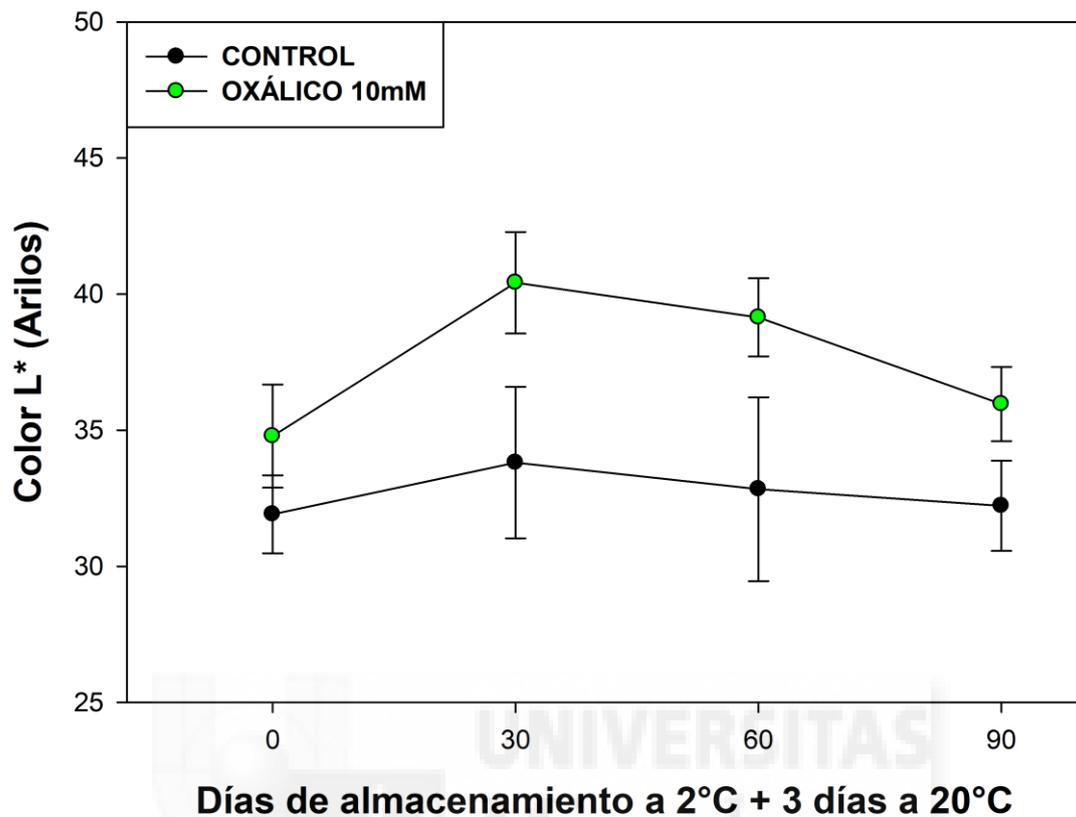
*Figura 8.* Evolución del color Croma\* de la corteza de las granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

#### 4.3.2. Efecto sobre el color de los arilos de las granadas.

En cuanto a los arilos, se estudió el efecto del elicitor a lo largo del tiempo de almacenamiento, en los parámetros  $L^*$  y  $Hue^*$ , empleando el sistema CIELab.

Por una parte, en la *Figura 9*, se muestra la evolución del parámetro  $L^*$ , correspondiente a la luminosidad. Los frutos tratados con ácido oxálico presentan mayor luminosidad en comparación con los frutos controles, desde el día de la recolección (día cero), hasta incluso después de noventa días de almacenamiento a 2 °C y tres días a 20 °C. Los valores iniciales de luminosidad del día cero son  $31,91 \pm 1,43$  y  $34,78 \pm 1,89$  para los controles y los frutos tratados, respectivamente.

Tras los resultados obtenidos se puede afirmar que el ácido oxálico ejerce un efecto beneficioso sobre la luminosidad ( $L^*$ ), probablemente debido a las menores pérdidas de peso como se ha descrito anteriormente.

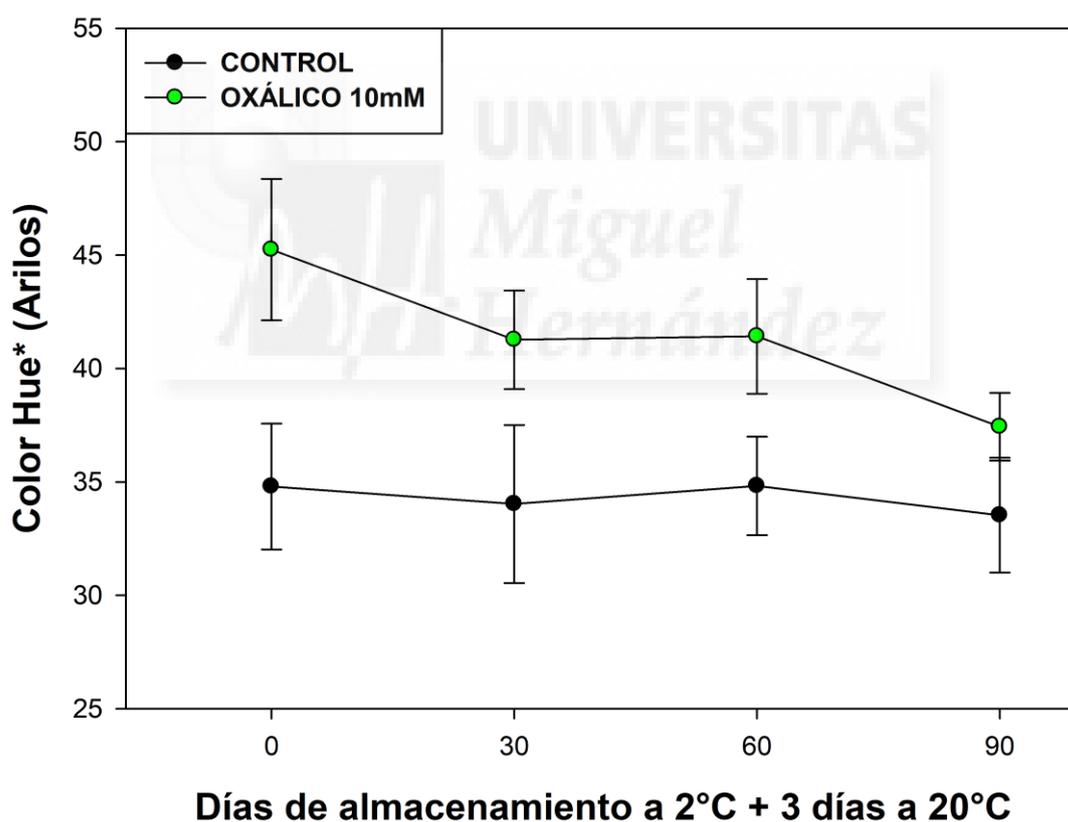


**Figura 9.** Evolución del color L\* de los arillos de las granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

Por otra parte, se determinó el parámetro Hue\* (tono), quedando reflejados los resultados obtenidos sobre dicho parámetro en la **Figura 10**. Como se puede observar, el parámetro Hue\* es mayor en las granadas tratadas con el elicitor en el día de la recolección, observándose también que, conforme avanza el tiempo de almacenamiento, se produce una reducción pronunciada en los valores de dicho parámetro. Sin embargo, cabe destacar que, a pesar de que se produzca dicha reducción, los valores tras los noventa días de almacenamiento continúan siendo mayores que en las granadas control.

Tras los resultados obtenidos relativos al color de las granadas tratadas con ácido oxálico 10mM y controles, se puede afirmar que, desde el punto de vista del color, la aplicación de ácido oxálico en pre-cosecha ejerce un efecto positivo, ya que los valores en los frutos tratados con ácido oxálico fueron siempre superiores a los mostrados por los frutos control.

Aunque no existe información disponible del mecanismo mediante el cual el ácido oxálico es capaz de mantener o incrementar el color de las granadas, se ha postulado que el ácido oxálico podría estar estimulando la síntesis de antocianinas en la piel (Sayyari et al., 2010).



*Figura 10.* Evolución del color Hue\* de los arilos de las granadas tratadas en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

#### **4.4. EVOLUCIÓN DE LA FIRMEZA DE LAS GRANADAS TRATADAS CON ÁCIDO OXÁLICO Y CONTROLES DURANTE DISTINTOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO.**

La textura de un fruto se puede definir como, la sensación general que se obtiene en la boca al morder y masticar un fruto y que comprende características mecánicas, como dureza, crujibilidad y viscosidad, características químicas, como contenido en jugo y en grasas (Sams, 1999).

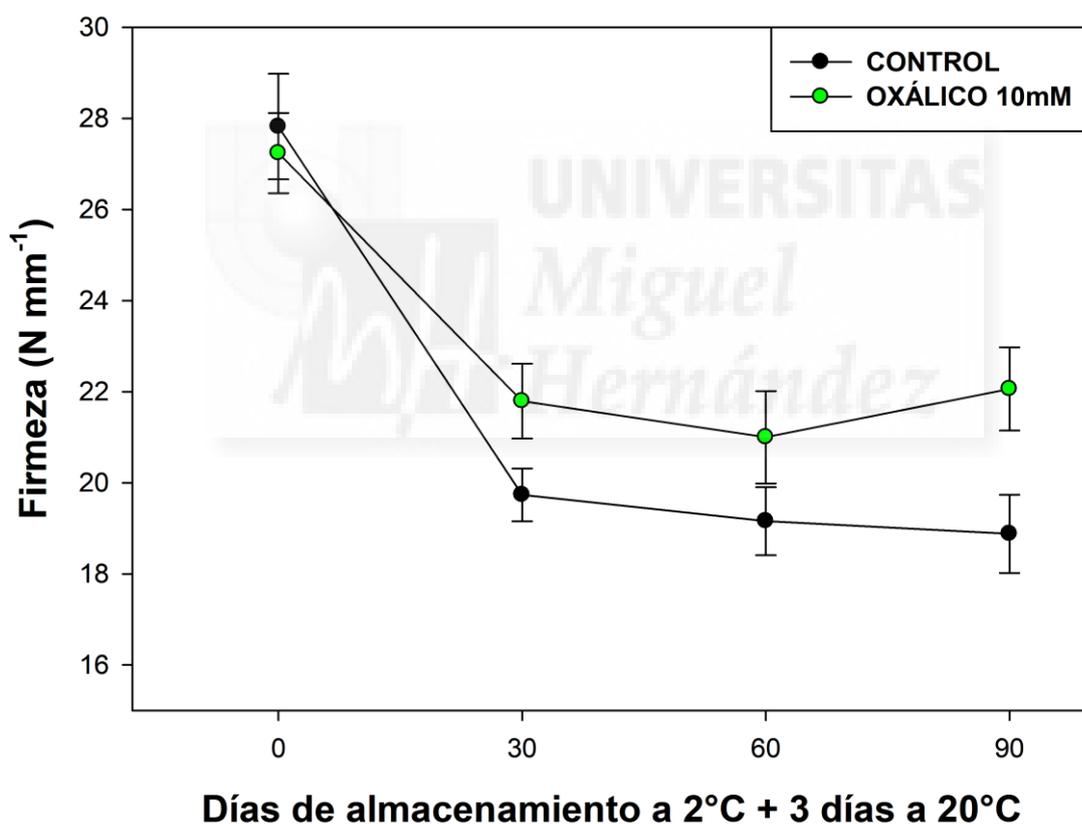
La textura de frutas y hortalizas sufre una serie de cambios que comienzan desde que el fruto se encuentra en la planta y se mantienen incluso durante el almacenamiento en post-cosecha. Dichos cambios en la textura son debidos a la actividad hidrolítica de enzimas que se encargan de degradar pectinas, celulosas y hemicelulosas de la pared celular (Brummell y Harpster, 2001; Lasbrook, 2005; Valero y Serrano, 2010; Paniagua et al., 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, la textura también se ve influenciada por los procesos de transpiración, que además de producir una pérdida de peso, conlleva también a una reducción de la turgencia del fruto, es decir de la firmeza del mismo (Woods, 1990). Y esta pérdida de la turgencia, conlleva al ablandamiento del fruto, y con ello se produce una aumento de la susceptibilidad de ataques por parte de microorganismos o a la aparición de daños durante la manipulación (Goulao y Oliveira, 2008).

Con respecto a la firmeza de las granadas de nuestro estudio, se puede observar que tanto en las granadas tratadas con ácido oxálico 10mM, como en las granadas control, se produce una reducción de la firmeza durante el almacenamiento. Dicha reducción es más pronunciada durante los primeros treinta días de almacenamiento a 2 °C y los tres días siguientes a 20 °C, reduciéndose los valores iniciales de firmeza ( $\text{N mm}^{-1}$ ) correspondientes a 27,82

$\pm 1,16$  en los frutos controles y  $27,23 \pm 0,88$  en los frutos tratados, a valores de  $19,73 \pm 0,58$  y  $21,79 \pm 0,82$  en controles y tratados, respectivamente.

Es importante resaltar que las granadas tratadas con el elicitor ácido oxálico presentaron menores pérdidas de firmeza durante el almacenamiento post-cosecha. Esto se puede deber a la formación de pectinas-oxalato insolubles, que ralentizan el ablandamiento durante la maduración de la granada en el árbol o a una menor actividad de las enzimas de degradación de la pared celular durante el almacenamiento (Wu et al., 2011; Valero et al., 2011).



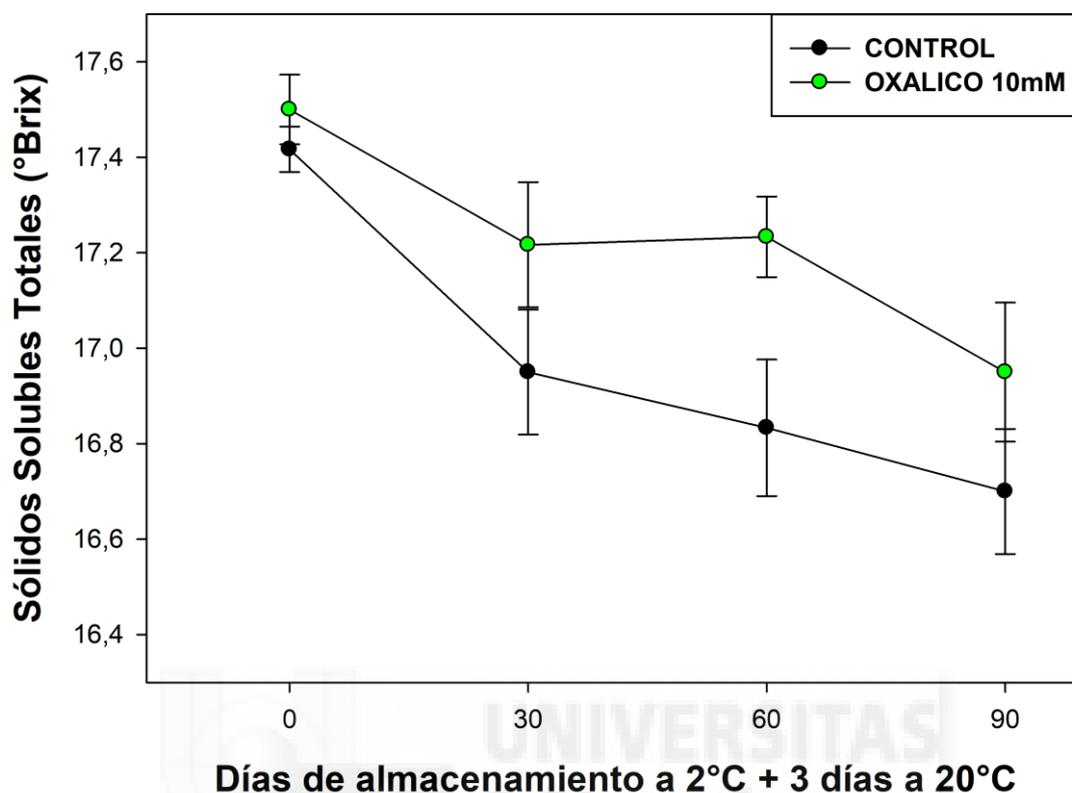
*Figura 11.* Evolución de la firmeza de los frutos tratados en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

#### 4.5. EVOLUCIÓN DE LOS SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES DE LAS GRANADAS TRATADAS CON ÁCIDO OXÁLICO Y CONTROLES DURANTE DISTINTOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO.

Las características organolépticas de las frutas dependen de su composición química, sobre todo en cuanto al sabor y aroma, que depende del contenido de azúcares, ácidos orgánicos y los compuestos volátiles presentes en el mismo. Los azúcares se acumulan en las frutas durante el desarrollo en la planta. Por ello, cuanto mayor sea tiempo de maduración en la planta, mayor será el contenido de sólidos solubles en la fruta. Esto es debido a que se producen reacciones de hidrólisis de los azúcares, principalmente de almidón, sobre todo en las últimas etapas de desarrollo de la fruta y durante la post-recolección (Knee, 1993).

Respecto a la evolución de los sólidos solubles totales, expresados en °Brix, obtenidos en el presente estudio (*Figura 12*), se produce una importante pérdida del contenido de los mismos, tanto en granadas tratadas con ácido oxálico, como en las granadas control. En ambos casos, la reducción del contenido de sólidos solubles es más pronunciada durante los primeros treinta días de almacenamiento. Es importante resaltar que la pérdida de los sólidos solubles totales es mayor en los frutos control, alcanzándose valores de  $16,70 \pm 0,13$  tras noventa días de almacenamiento a  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y tres días a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Según fuentes consultadas, el contenido de sólidos solubles está relacionado con el metabolismo del fruto, en concreto con la tasa de respiración (Gol et al., 2013). Esto se puede ver reflejado al comparar los datos reflejados en *Figura 5* y *Figura 12* en el caso de las granadas tratadas con el elicitor ácido oxálico, por lo que una menor respiración daría lugar a una mayor acumulación de azúcares en los arilos (Sayyari et al., 2010).

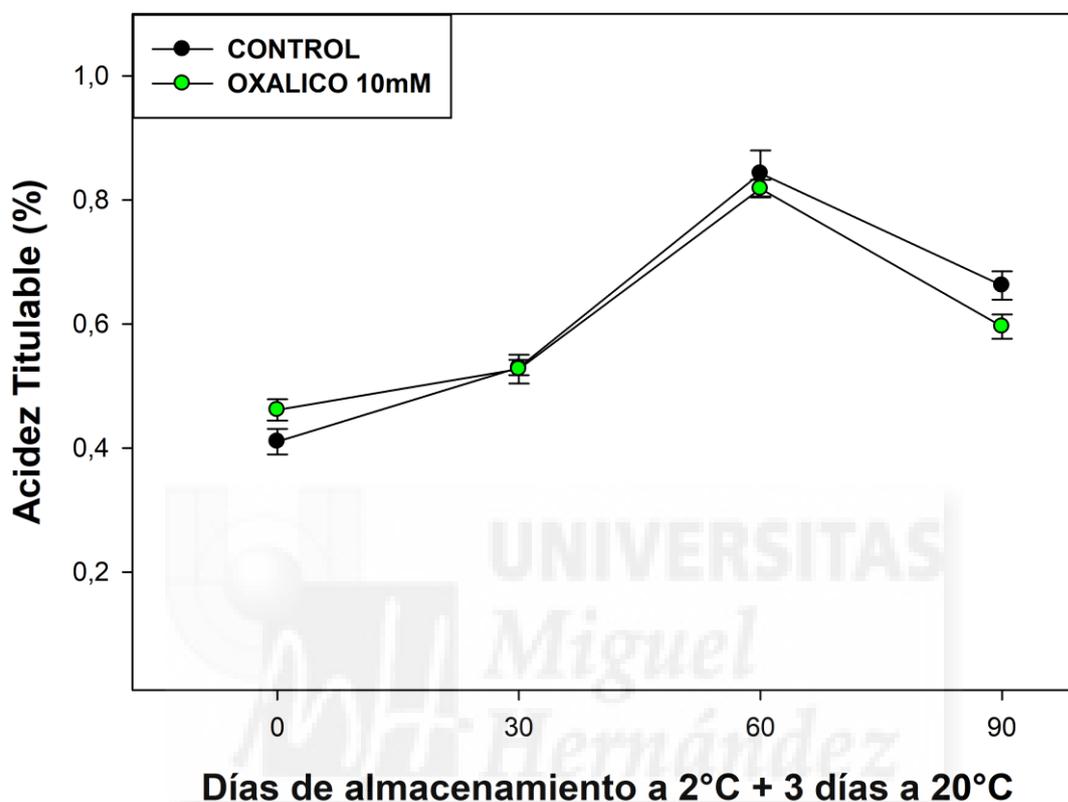


*Figura 12.* Evolución de los sólidos solubles totales de los frutos tratados en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

#### 4.6. EVOLUCIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE DE LOS FRUTOS TRATADOS CON ÁCIDO OXÁLICO Y CONTROLES DURANTE DISTINTOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO.

En la *Figura 13* se reflejan los resultados obtenidos en relación a la evolución durante el almacenamiento de la acidez titulable de los frutos controles y tratados con ácido oxálico 10mM. Como se puede observar, ambas muestras presentan una tendencia similar, produciéndose un aumento del parámetro en cuestión durante los sesenta primeros días de almacenamiento, alcanzándose los

valores máximos ( $0,84 \pm 0,04$  % en las granadas control y  $0,82 \pm 0,01$  % en las tratadas) sin mostrar diferencias significativas entre tratamientos.

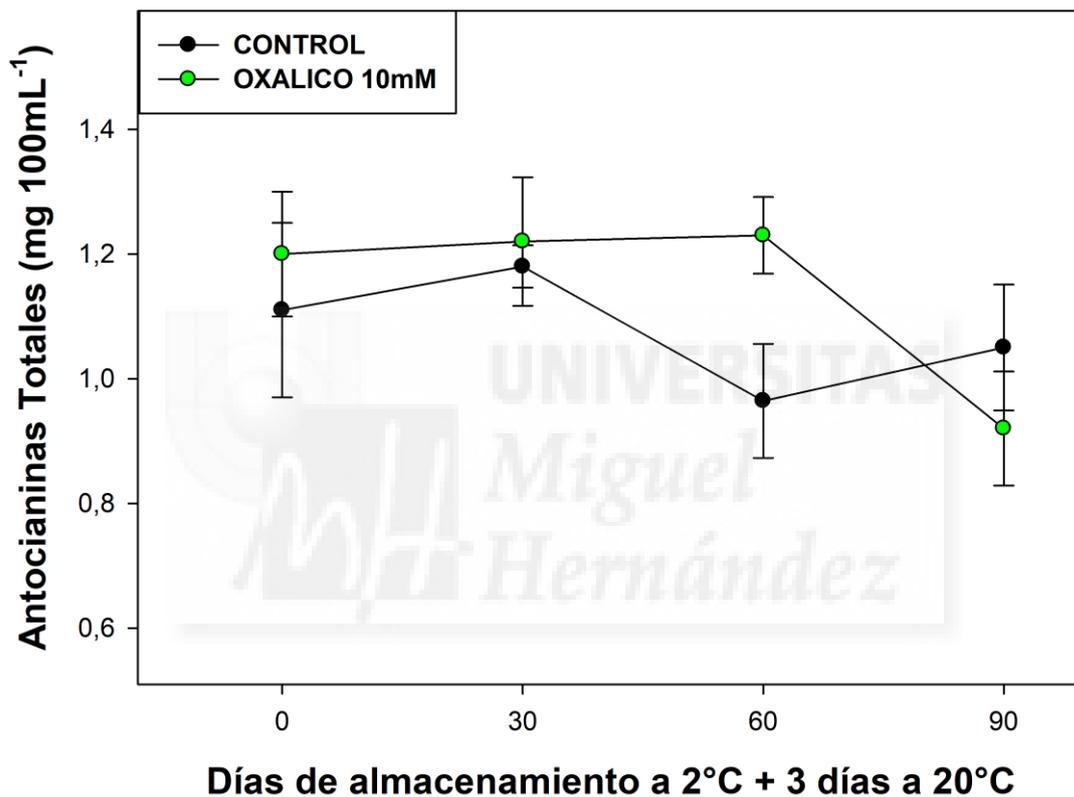


*Figura 13.* Evolución de la acidez titulable de los frutos tratados en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

#### 4.7. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS TOTALES DE LOS FRUTOS TRATADOS CON ÁCIDO OXÁLICO Y CONTROLES DURANTE DISTINTOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO.

Con respecto al contenido de antocianinas totales (*Figura 14*), se puede observar que los frutos tratados con ácido oxálico, en comparación con los frutos controles, presentan mayores valores desde el momento de la recolección ( $1,20 \pm 0,10$ ), hasta los sesenta días de almacenamiento ( $1,23 \pm 0,06$ ).

Aunque no existen estudios que relacionen las aplicaciones de ácido oxálico con el incremento de la biosíntesis de antocianinas, Sayyari et al., (2010) postularon que el ácido oxálico podría estar actuando como elicitador estimulando la biosíntesis de este compuesto bioactivo, principalmente mediante la estimulación de la enzima PAL responsable de la formación de estos compuestos.



*Figura 14.* Evolución de las antocianinas totales de los frutos tratados en pre-cosecha con ácido oxálico 10mM y controles durante distintos tiempos de almacenamiento.

## 5. CONCLUSIONES

Tras estudiar los distintos datos obtenidos de este Trabajo Final de Grado y en referencia al estudio realizado sobre la aplicación de ácido oxálico 10mM durante el periodo pre-cosecha de la granada 'Mollar', concluimos que la aplicación de este compuesto fue efectiva mejorando la calidad en el momento de la cosecha de las granadas.

Los tratamientos con ácido oxálico fueron efectivos a la hora de mejorar la producción total probablemente debido al incremento del peso de los frutos individuales ya que el número de frutos por árbol sólo fue afectado ligeramente. Asimismo, el tratamiento pre-cosecha tuvo un impacto positivo sobre la calidad post-cosecha principalmente sobre las pérdidas de peso, la tasa de respiración y la firmeza de los frutos por lo que estos tratamientos aumentarían la vida útil de los mismos.

Por tanto, los tratamientos con ácido oxálico 10mM aplicados en el periodo pre-cosecha, podrían ser considerados como una herramienta, segura y respetuosa con el medio ambiente, con potencial para tanto incrementar las producciones totales como los atributos de calidad de las granadas tanto en el momento de la recolección como durante su posterior conservación post-cosecha.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**Abbott, J.A. 1999.** Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, 15: 207-225.

**Abeles, F.B., Morgan, P.W. y Saltveit, M.E. 1992.** Ethylene in Plant biology Second edition. 182-221. Academic Press Inc., San Diego, CA. ISBN 0-12-041451-1.

**Al-Maiman, S.A. y Ahmad, D. 2002.** Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit maturation. *Food Chem.*, 76: 437-441.

**Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D. y Fuhrman, B. 2000.** Pomegranate Juice Consumption Reduces Oxidative Stress, Atherogenic Modifications to LDL and Platelet Aggregation: Studies in Humans and in Atherosclerotic Apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5): 1062-1076.

**Baenas, N., García-Viguera, C. y Moreno, D.A. 2014.** Biotic Elicitors Effectively Increase the Glucosinolates Content in *Brassicaceae* Sprouts. *American Chemical Society*, 62(8): 1881-1889.

**Barba-Teodoro, A. 2015.** Nuevas tecnologías poscosecha para la conservación en fresco de la alcachofa Blanca de Tudela. Trabajo Fin de Carrera. Universidad Miguel Hernández de Elche (EPSO).

**Bellostas, N., Sørensen, A.D., Sørensen, J.C. y Sørensen, H. 2007.** Genetic variation and metabolism of glucosinolates in cruciferous oilseed crops. In: *Rapeseed Breeding: Advances in Botanical Research* (Ed. Dr. Surinder Gupta) Academic Press/ Elsevier, Dan Diego, vol. 54.

**Ben-Arie, R., Segal, N. y Guelfat-Reich, S. 1984.** The maturation and ripening of the 'Wonderful' pomegranate. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109: 898-902.

**Blanpied, G.D. y Wilde, M.H. 1968.** A study of the cells in the outer flesh of developing 'McIntosh' apple fruit. *Bot. Gaz.*, 129: 173- 183.

**Brummell, D.A. y Harpster, M.H. 2001.** Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*. 47: 311-340.

**Crisosto, C., Johnson, R. y Dejong, T. 1997.** Orchard factors affecting postharvest stone fruit quality. *Hortsciencie*. 32: 820–823.

**Escriche, A., Artés, F. y Marín, J.G. 1992.** Conservation in atmosphère contrôlée. *Refrigeration Science and Technology*. 5: 336-341.

**Gil, A. 2010.** Tratado de Nutrición, Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos (2ªed.) Tomo II. (Ed.) Médica Panamericana S.A. 165-182.

**Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. y Kader, A.A. 2000.** Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and its Relationship with Phenolic composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10): 4581-4589.

**Gillaspy, G., Ben-David, H. y Gruissem, W. 1993.** Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell.*, 5: 1439-1451.

**Giovannoni, J. 2001.** Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 52: 725-749.

**Gol, N.B., Patel, P.R. y Rao, T.V. 2013.** Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85: 185-195.

**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.

**Griggs, W.H., e Iwakiri, B.T. 1956.** A comparison of methods in obtaining growth curves of Bartlett pears. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 67: 91-94.

**Gur, A. 1986.** *Punica granatum* In: A. H. Halevy (ed.). *CRC Handbook of flowering* Vol. IV, CRC Press. Florida, USA. pp. 147-150.

**Ho, L.C. 1996.** The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *J. Expt. Bot.*, 47: 1239- 1243.

**Huang, H., Jing, G., Guo, L., Zhang, D., Yang, B., Duan, X., Ashraf, M. y Jiang, Y. 2013.** Effect of oxalic acid on ripening attributes of banana fruit during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 84: 22–27.

**Kashiwada, Y., Nonaka, G.I., Nishioka, I., Chang, J.J. y Lee, K.H. 1992.** Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *J. Nat. Prod.*, 55: 1033-1043.

**Kays, S.J. 1999.** Preharvest factors affecting appearance. *Postharvest Biol. Technol.*, 15: 233-247.

**Knee, M. 1993. Pome fruits.** In *Biochemistry of Fruit Ripening*, Seymour, G. B., Taylor. J. E., Tucker, G. A., Eds., Chapman and Hall: New York, pp 325-346.

**Lasbrook, C.C. 2005.** New insights into cell disassembly during fruit ripening. *Stewart Postharvest Review*. 3: 2.

**Lee, J. y Watson, R. 1998.** Pomegranate: a role in health promotion and AIDS. *Nutrients and Foods in Aids*, 213-216.

**Lelièvre, J.M., Latché, A., Jones, V., Bouzayen, M. y Pech, J.C. 1997.** Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*. 101: 727-739.

**Magein, H. 1989.** Growth and abscission dynamics of 'Cox's Orange Pippin' and 'Golden Delicious' apple fruits. *J. Hort. Sci.*, 64: 265-273.

**Martí, N., Pérez-Vicente, A. y García-Viguera, C. 2001.** Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 217-221.

**Martínez-Esplá, A., Zapata, P. J., Valero, D., García-Viguera, C., Castillo, S. C., y 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-Esplá, A., García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., Guillén, F., Serrano, M., Valero D. y Gironés-Vilaplana, A. 2017.** Preharvest application of oxalic acid improves quality and phytochemical content of artichoke (*Cynara scolymus* L.) at harvest and during storage. *Food Chemistry*. 230: 343–349.

**Melgarejo, P. 1993.** Selección y tipificación varietal de granado (*Punica granatum* L.). Tesis Doctoral. Univ. Politécnica de Valencia (UPV).

**Melillo, L. 1994.** Diuretic plants in the paintings of pompeii. *American Journal of Nephrology*, 14(4-6): 423-425.

**Ness, A.R. y Powles, J.W. 1997.** Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26(1): 1-13.

**Neufeldt, V.E. 1988.** Webster's New World Dictionary, 3rd college ed. Simon and Schuster, New York.

**Opara, L.U. 2000.** Fruit growth measurement and analysis. Hort. Rev., 24: 373-431.

**Paniagua, C., Posé, S., Morris, V.J., Kirby, A.R., Quesada, M.A. y 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.

**Patil, A.V. y Karale, A.R. 1990.** Pomegranate In: T. K. Bose and S. K. Mitra (eds.). Fruits: tropical and subtropical. Naya Prokash, Calcutta, India. pp: 615-637.

**Pérez-Balibrea, S., Moreno, D.A. y García-Viguera, C. 2008.** Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 88: 904-910.

**Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P. y García-Viguera, C. 2004.** Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. Science of Food and Agriculture, 84: 639-644.

**Ray, P.K. 2002.** Breeding Tropical and Subtropical fruits. Alpha Science International Ltd., Pangbourne, UK.

**Razavi, F. y Hajilou, J. 2016.** Enhancement of postharvest nutritional quality and antioxidant capacity of peach fruits by preharvest oxalic acid treatment. Scientia Horticulturae. 200: 95-101.

**Reid, M.S. 2002.** Maturation and maturity indices. Postharvest technology of horticultural crops., 3: 55-62.

**Ruiz-García, Y. y Gómez-Plaza, E. 2013.** Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture*, 3: 33-52.

**Ruíz-Jiménez, J.M., Zapata, P.J., Serrano, M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Castillo, S. y Guillén, F. 2014.** Effect of oxalic acid on quality attributes of artichokes stored at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*. 95: 60-63.

**Sams, C.E. 1999.** *Postharvest Biology and Technology*. 15: 249-254.

**Sayyari, M., Valero, D., Babalar, M., Kalantari, S., Zapata, P.J. y Serrano, M. 2010.** Prestorage oxalic acid treatment maintained visual quality, bioactive compounds, and antioxidant potential of pomegranate after long-term storage at 2°C. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6804–6808.

**Schechter, I., Proctor, J.T.A. y Elfving, D.C. 1993.** Characterization of seasonal fruit growth of 'Idarel' apple. *Scient. Hort.*, 54: 203-210.

**Shewfelt, R.L. 1999.** What is quality? *Postharvest Biol. Technol.* 15: 197-200.

**Singh, R.P., Chidambara Murthy, K.N. y Jayaprakasha, G.K. 2002.** Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 81-86.

**Singh, R.P., Kar, P.L. y Dhuria, H.S. 1978.** Studies on the behaviour of flowering and sex expression in some pomegranate cultivars. *Plant Sci.*, 10: 29-31.

**Smith, P.M. 1976.** Minor crops In: N. W. Simmonds (ed.). *Evolution of Crop Plants*. Longman, London, UK. pp. 301-324.

**Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, G.N. y Mathé, G. 2002.** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed Pharmacother*, 56(4): 200-7.

**Terry, L.A. y Joyce, D.C. 2004.** Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32: 1-13.

**Valero, D. y Serrano, M. 2010.** *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*, CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA.

**Valero, D., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D. y 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.

**Watada, A.E., Hener, R.C., Kadar, A.A., Romani, R.J. y Staby, G.L. 1984.** Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *HortScience*, 19: 20- 21.

**Woods, J.L. 1990.** Moisture loss from fruits and vegetables. *Postharvest News and Information*. 1: 195-199.

**Worrel, D.B., Carrington, C.M.S. y Huber, D.J.H. 1998.** Growth, maturation and ripening of breadfruit (*Artocarpus altilis*). *Scient. Hort*, 79: 17-28.

**Wu, F., Zhang, D., Zhang, H., Jiang, G., Su, X., Qu, H., Jiang, Y. y Duan, X. 2011.** Physiological and biochemical response of harvested plum fruit to oxalic acid during ripening or shelf-life. *Food Research International*. 44: 1299-1305.

Zhu, Y., Yu, J., Brecht, J. K., Jiang, T. y Zheng, X. 2016. Pre-harvest application of oxalic acid increases quality and resistance to *Penicillium expansum* in kiwifruit during postharvest storage. Food Chemistry. 190: 537-543.

#### 6.1. PÁGINAS WEB CONSULTADAS.

- BEDCA (Base de Datos Española de Composición de Alimentos) [www.bedca.net](http://www.bedca.net). Consulta en Junio de 2018.
- Cambayas Coop. V., Granadas Elche 2018 [www.cambayas.com](http://www.cambayas.com). Consulta en Junio de 2018.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), Anuario de Estadística [www.mapama.gob.es](http://www.mapama.gob.es). Consulta en Junio de 2018.

