

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



Sensibilidad a los Daños por Frío en Diferentes Variedades de Granada

AUTOR: GUAL BARROSO, FERNANDO

Nº expediente: 323

TUTORA: Dra. MARÍA SERRANO MULA

COTUTOR: Dr. DANIEL VALERO GARRIDO

Departamento de Biología Aplicada, Área de Fisiología Vegetal

Curso académico 2024 – 2025

Convocatoria de Febrero

Resumen:

Este trabajo evalúa la susceptibilidad al daño por frío (*chilling injury*, CI) en ocho cultivares de granada (*Punica granatum L.*) almacenados en condiciones refrigeradas. Se observaron diferencias significativas entre las variedades, siendo Mollar de Elche, Mollar-100 y Purple Queen las más tolerantes, mientras que Wonderful, Bigful y Kingdom mostraron mayor sensibilidad. Los índices de CI se relacionaron directamente con la fuga de electrolitos (*Ion Leakage*, IL), confirmando que este parámetro es un indicador clave de la integridad de las membranas celulares. Sin embargo, no se halló correlación entre los índices de CI y el contenido de fenoles totales o la actividad de polifenoloxidasas (PPO). Por tanto, la diferente sensibilidad de las variedades de granada al CI no se debe a su contenido en fenoles o a la diferente actividad PPO, sino que podría deberse al mejor mantenimiento de la estructura y funcionalidad de las membranas celulares, posiblemente por su mayor contenido en ácidos grasos insaturados, lo que requiere futuras investigaciones.

Palabras clave: Almacenamiento, Calidad, Daño por Frío, Fenoles totales, Fuga de electrolitos, *Punica granatum*.

Abstract:

This study evaluates the susceptibility to chilling injury (CI) in eight cultivars of pomegranate (*Punica granatum L.*) stored under refrigerated conditions. Significant differences were observed among varieties, with Mollar de Elche, Mollar-100 and Purple Queen demonstrating the highest tolerance, while Wonderful, Bigful and Kingdom exhibited higher sensitivity. The investigation established a direct correlation between CI indices and Ion Leakage (IL), thereby confirming the latter as a key indicator of cell membrane integrity. However, no correlation was found between IQ indices and total phenol content or polyphenol oxidase (PPO) activity. Therefore, the different sensitivity of pomegranate varieties to CI is not due to their phenol content or different PPO activity but could be due to the better maintenance of the structure and functionality of cell membranes, possibly due to their higher content of unsaturated fatty acids, which requires future research.

Keywords: Chilling Injury, Ion Leakage, *Punica granatum*, Quality, Storage, Total Phenols.

Contenido

Introducción	4
<i>Punica granatum</i> y sus características.....	4
Calidad durante la conservación.....	5
Antecedentes y Objetivos.....	6
Antecedentes.....	6
Objetivos.....	7
Materiales y Métodos	7
Material vegetal y diseño experimental.....	7
Valoración visual de los daños por frío	9
Fuga de Electrolitos	10
Cuantificación de Fenoles Totales	10
Cuantificación de la Actividad Polifenol Oxidasa.....	11
Análisis estadístico	11
Resultados	11
Daños por Frío.....	11
Fenoles Totales	13
Discusión.....	18
Conclusiones y Proyección Futura.....	20
Conclusiones.....	20
Proyección Futura.....	20
Bibliografía.....	21

Introducción

Punica granatum y sus características

La granada (*Punica granatum* L.) es una de las frutas comestibles más antiguas, muy valorada debido a sus propiedades organolépticas, nutricionales y beneficiosas para la salud, y está asociada a las antiguas civilizaciones de Oriente Próximo. Desde su origen, en la zona que hoy ocupan Irán y Afganistán, la granada se extendió hacia a la India, China, y a los países mediterráneos como Turquía, Egipto, Túnez, Marruecos y España (Pareek et al., 2015). En concreto, en España, la superficie cultivada de granada fue de 5.327 ha en 2022, con una producción de unas 80.000 t, siendo las regiones del sureste responsables de más del 70% del total de la producción española (MAPA, 2022).

Aunque se han descrito diferencias significativas en los azúcares y los ácidos orgánicos entre cultivares, estos parámetros son los principales compuestos responsables de las características sensoriales y, según su concentración relativa, los cultivares de granada se agrupan en genotipos dulces, agridulces o ácidos (Stiletto y Trestini, 2021). Por otro lado, el impacto beneficioso para la salud del consumo de granada se atribuye a su contenido en compuestos polifenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos hidrolizables, los cuales se han relacionado con la prevención de varias enfermedades mediadas por inflamación, entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, así como la diabetes y distintos tipos de cáncer, ya que tienen propiedades antiproliferativas, antiinvasivas y antimetastásicas (Bassiri-Jahromi, 2018; Melgarejo-Sánchez et al., 2021; Cheng et al., 2023).

El fruto puede dividirse en tres partes: la corteza, las membranas carpelares y las semillas (Lansky y Newman, 2007; Melgarejo-Sánchez et al., 2021). La parte comestible es la testa, una capa externa de la semilla, que suele ser confundida erróneamente con un arilo debido a su apariencia jugosa y pulposa. Sin embargo, desde un punto de vista botánico, la granada es un fruto exarilado, lo que significa que carece de arilos (Melgarejo et al., 2024). La parte comestible de la granada representa alrededor del 55-60% del peso total del fruto y contiene un 80% de zumo y un 20% de semillas. El zumo fresco contiene un 85% de agua y un 15% de azúcares, pectinas, ácido ascórbico, polifenoles, flavonoides, antocianinas y aminoácidos (Kader, 2006). La granada se explota por el valor nutritivo de su fruto, las propiedades medicinales de distintas partes del árbol y su uso decorativo (Meerts et al., 2009; Johanningsmeier et al., 2011).

Las granadas se consumen principalmente en fresco y en formas procesadas como zumo, mermelada, jalea, vinagre, vino, aceite y suplementos alimenticios (Pareek et al., 2015). Son

una fuente natural de hidratos de carbono, fibras y minerales, así como de compuestos biológicamente activos, como las vitaminas A, C y E, y compuestos fenólicos como la punicalagina, el ácido eláxico, los galotaninos y las antocianinas (Arendse et al., 2015), conocidos por actuar como antioxidantes naturales.

La corta duración de la temporada de recolección en otoño, que apenas abarca tres meses, restringe significativamente la disponibilidad y el consumo de granadas en el mercado. No obstante, éstas pueden ser almacenadas durante varios meses en cámaras frigoríficas y húmedas, prolongando así su disponibilidad (Hess-Pierce et al., 2003).

Calidad durante la conservación.

Al igual que otras frutas tropicales y subtropicales, la calidad de la granada disminuye después de la cosecha debido a factores como la pérdida de peso, la escaldadura de la piel, la disminución de compuestos nutritivos y bioactivos en las testas, y la aparición de podredumbres.

Entre los problemas postcosecha más relevantes se encuentran los daños por frío o *chilling injury* (CI), que afectan a granadas almacenadas a temperaturas inferiores a 6-10 °C, dependiendo del cultivar (Pareek et al., 2015; Kashash et al., 2019). El CI se caracteriza por la presencia de lesiones y manchas marrones en la piel externa y por una decoloración marrón en la superficie interna de la piel y las membranas carpelares, así como por el cambio de color de las testas de rojo a marrón (Arendse, 2014; Kashash et al., 2019; Mishra et al., 2022; Maghoumi et al., 2023). Generalmente, estos síntomas comienzan a manifestarse tras 6-8 semanas de almacenamiento a temperaturas ≤ 5 °C (Maghoumi et al., 2022a).

El principal desencadenante del CI es el daño a las membranas celulares, que pierden su permeabilidad selectiva, lo que provoca fugas de iones y moléculas pequeñas, pérdida de compartimentación y mezclas de compuestos celulares. Esto permite que la polifenol oxidasa (PPO) citoplasmática oxide los compuestos fenólicos almacenados en las vacuolas, generando el pardeamiento de los tejidos (Liang et al., 2020; Mishra et al., 2022). Además, el estrés oxidativo asociado al CI provoca la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que contribuye a la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daño al ADN y ARN (Cisneros-Zevallos y Jacobo-Velázquez, 2020; Liang et al., 2020; Maghoumi et al., 2023).

Es importante señalar que la intensidad del pardeamiento varía entre los diferentes tejidos de la granada: es más pronunciada en la piel, moderada en las membranas carpelares y mínima en las testas. Para cuantificar visualmente estos cambios, se utilizan escalas hedónicas de niveles 0 a 5, pudiendo describirse cada nivel de la siguiente manera: 0 [sin pardeamiento], 1 [menos del

20 %], 2 [20-40 %], 3 [41-60], 4 [61-80] y 5 [más del 80 %]; y donde valores altos indican también mayor susceptibilidad a infecciones fúngicas y depresión superficial causada por la muerte celular (Maghoumi et al., 2023).

Este fenómeno es diferente al escaldado de la granada, que se presenta a temperaturas superiores a 10 °C tras un almacenamiento prolongado de 10-12 semanas. El escaldado está mediado por el ácido abscísico (ABA) y, aunque ambos procesos involucran daño a las membranas y actividad de la PPO, el escaldado no afecta a las membranas carpelares ni a las testas. Por ello, su evaluación mediante una escala hedónica se basa únicamente en el porcentaje de pardeamiento de la piel (Maghoumi et al., 2022b; Maghoumi et al., 2023).

Antecedentes y Objetivos

Antecedentes

Los estudios sobre la granada (*Punica granatum* L.) han experimentado un notable crecimiento debido a su riqueza en compuestos bioactivos, destacando su capacidad antioxidante y sus beneficios para la salud humana. En particular, investigaciones recientes se han centrado en entender los factores que afectan su conservación en almacenamiento refrigerado, ya que esta fruta es altamente sensible al daño por frío (CI), un desorden fisiológico que provoca la decoloración de la cáscara, pardeamiento y pérdida de textura en condiciones de baja temperatura. Esta sensibilidad es dependiente de la variedad y del tiempo de exposición a bajas temperaturas, presentando efectos más severos en variedades como Wonderful y Ganesh (Lorente-Mento et al., 2023).

En respuesta a esta problemática, diversos estudios han explorado tratamientos pre y postcosecha que mitigan los síntomas de daño por frío en granadas. Por ejemplo, aplicaciones de ácido salicílico, jasmonato de metilo (MeJa) y poliaminas han demostrado reducir los daños por frío y mantener la integridad de las membranas celulares al promover la preservación de ácidos grasos insaturados en la piel de la fruta (García-Pastor et al., 2020a). Además, estos tratamientos potencian el contenido de fenoles y antocianinas, lo que contribuye a una mayor estabilidad antioxidante durante el almacenamiento en frío (García-Pastor et al., 2020b).

La estructura de las membranas biológicas en la granada juega un rol crucial en su respuesta al estrés por frío. El deterioro de las membranas, principalmente causado por la peroxidación de lípidos, se traduce en pérdida de permeabilidad y daño estructural en las células de la piel y las testas (Valdenegro et al., 2022). La susceptibilidad de las granadas al daño por frío se ha relacionado también con la concentración de azúcares, ácidos orgánicos y ciertos minerales que, según diversos estudios, varía significativamente entre cultivares (Lorente-Mento et al., 2023).

Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la susceptibilidad a los daños por frío en ocho cultivares de granada (*Punica granatum* L.) cultivados en fincas comerciales del sureste español, bajo condiciones climáticas y agronómicas similares, y su relación con la calidad externa e interna de los frutos durante el almacenamiento en frío. Para ello, se analizaron los índices de daños por frío en la parte interna y externa de la piel de la granada, su contenido de compuestos fenólicos y la actividad polifenol oxidasa y las correlaciones entre estos parámetros.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

- Identificar y describir los síntomas característicos del daño por frío en las granadas almacenadas a baja temperatura en función de la variedad.
- Cuantificar el impacto del daño por frío en la fuga de electrolitos y su relación en las distintas variedades de granada estudiadas.
- Analizar la composición de compuestos fenólicos y la actividad PPO y determinar su influencia en la susceptibilidad al estrés por frío en las distintas variedades.

Materiales y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

Los materiales vegetales utilizados a lo largo de los experimentos fueron granadas (*Punica granatum* L) de las variedades ACCO, Bigfull, Kingdon, Mollar de Elche, Mollar-100, Purple Queen, Smith y Wonderfull, recolectadas de un huerto comercial en Elche (Alicante) cuando estaban en estado de maduración comercial y se transportaron inmediatamente al laboratorio para su posterior análisis y conservación.

La variedad ACCO se caracteriza por su equilibrio entre dulzura y acidez, lo que la hace ideal para el consumo fresco y la elaboración de zumos. Destaca por su alto rendimiento de testas, un perfil semiácido con un pH más bajo en comparación con otras variedades dulces, y un contenido significativo de minerales como potasio y fósforo (Tozzi et al., 2020). Su piel roja brillante y su elevada capacidad antioxidante, atribuida a la presencia de antocianinas y polifenoles, la posicionan como una opción preferida en el mercado. Es una variedad temprana, cultivada entre agosto y septiembre, con semillas ricas en macrominerales, y estudios sugieren que el almacenamiento en atmósferas controladas prolonga su vida útil sin afectar las propiedades organolépticas (Montefusco et al., 2021; Moradinezhad y Ranjbar, 2023).

La variedad Bigful destaca por su tamaño imponente y su jugoso contenido interno. Es una granada de maduración tardía, cosechada principalmente desde mediados de octubre hasta principios de diciembre. Aunque puede ser vulnerable a los daños causados por el sol y las rajaduras, ofrece un excelente rendimiento y una calidad interna excepcional. Esta variedad es conocida por su sabor dulce y suavemente astringente, lo que la hace ideal tanto para consumir fresca como para producir jugo. Es rica en antioxidantes y nutrientes esenciales.

La variedad Kingdom es conocida por su productividad y tamaño grande, con un peso promedio de unos 500 g. Su zumo es rico en azúcares totales y ácidos orgánicos, especialmente cítrico. Tiene un pH bajo y una acidez alta, clasificada como semiácida. Es adecuada tanto para consumo fresco como para procesamiento de zumos debido a su contenido balanceado de nutrientes y compuestos fenólicos (Tozzi et al., 2020).

La variedad Mollar de Elche, la cual está protegida por una Denominación de Origen que incluye 40 municipios en Alicante, es ampliamente apreciada en España por su dulzura, semillas suaves y calidad organoléptica. Aunque su contenido en antioxidantes, como polifenoles y antocianinas, es menor en comparación con variedades como Wonderful, estos compuestos, responsables de su característico color rosado, le confieren propiedades antioxidantes significativas (Tozzi et al., 2020; Bassiri-Jahromi, 2018).

La variedad Purple Queen se caracteriza por su intenso color, que varía entre rojo y morado oscuro, reflejando una alta concentración de antocianinas y otros compuestos fenólicos, aunque inferior a la de la variedad Wonderful. Este color vibrante, combinado con su dulzura y un pH más alto que otras variedades ácidas, la hace adecuada para el consumo fresco, especialmente por su alta proporción de testas y su contenido en minerales como potasio (Tozzi et al., 2020; Montefusco et al., 2021).

La variedad Smith es apreciada por su sabor equilibrado y su piel resistente, lo que la hace adecuada tanto para consumo fresco como para transporte a largas distancias. Presenta un contenido considerable de compuestos bioactivos, incluyendo punicalaginas, lo que refuerza su perfil antioxidante. Además, se menciona su buen desempeño en condiciones de almacenamiento controlado, especialmente para evitar daños por frío (Moradinezhad y Ranjbar, 2023; Montefusco et al., 2021).

La variedad Wonderful es una de las más cultivadas y estudiadas a nivel global debido a su versatilidad y excelentes características. Destaca por su gran tamaño, piel roja brillante y testas con un sabor dulce-ácido intenso, así como por su alto contenido en azúcares totales, predominando la glucosa; y antocianinas, que le confieren un zumo de color oscuro asociado a altos beneficios antioxidantes (Tozzi et al., 2020). Además, contiene punicalaginas y vitamina

C, compuestos que refuerzan sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Esta variedad, clasificada como semiácida, es apta tanto para consumo fresco como para la elaboración de zumos, donde presenta un alto rendimiento, lo que la convierte en un producto clave para la industria alimentaria y nutracéutica (Moradinezhad y Ranjbar, 2023; Montefusco et al., 2021). Todas las variedades analizadas comparten un alto contenido en potasio como macromineral principal, acompañado de magnesio y vitamina C, así como una composición predominante de azúcares como glucosa y fructosa en el zumo. Además, destacan por su riqueza en compuestos fenólicos, particularmente antocianinas y polifenoles, responsables de su distintiva capacidad antioxidante. Estas variedades también presentan un zumo con sólidos solubles totales superiores a 12 °Brix, lo que las hace comercialmente atractivas para su procesamiento.

Los árboles de granada utilizados para los experimentos tenían 13 años desde el momento del cultivo. Las condiciones climáticas en el campo de cultivo fueron: clima mediterráneo semiárido, con una temperatura media de 19,52 °C; temperatura máxima en verano de 32,23 °C, y una precipitación acumulada de 233,37 mm. Se cultivaron en las mismas condiciones climatológicas y con las mismas condiciones de temperatura y suelo para asegurar que las diferencias entre los resultados se debiesen únicamente a las diferentes variedades genéticas.

En primer lugar, en el laboratorio se descartaron aquellas granadas que presentaban defectos visuales tales como magulladuras, grietas, cortes en la corteza o quemaduras, para a continuación ser seleccionados 90 frutos homogéneos para cada variedad que se dividieron en 18 lotes, de 5 frutos. Tres de ellos se usaron para determinar los diferentes parámetros en el día de la recolección (día 0) y los restantes se almacenaron a 2 °C durante 15, 30, 45, 60 y 75 días. Pasados estos tiempos de conservación en frío se tomaron tres lotes al azar y se colocaron 2 días a 20 °C, para simular condiciones de comercialización. Posteriormente, se realizaron las determinaciones analíticas que se detallan a continuación.

Valoración visual de los daños por frío

Se evaluaron visualmente los daños por frío de la superficie externa de la granada, en una escala hedónica con valores de 0 a 5, según el grado de daños observado: 0 (sin pardeamiento ni hendiduras), 1 (menos del 20 % de la superficie afectada por estos síntomas), 2 (20-40 % de superficie afectada), 3 (del 41 al 60 % de superficie afectada), 4 (del 61 al 80%) y 5 (más del 80 % de la superficie del fruto con síntomas de daños por frío). Posteriormente se cortó la granada por su perímetro ecuatorial, y se seccionó la corteza en forma de flor, para desgranarla y poder observar los daños por frío en la superficie interna de la piel. Estos daños se evaluaron y se otorgó un valor numérico según la escala hedónica citada anteriormente.

Fuga de Electrolitos

La fuga de electrolitos (Ion Leakage, IL) se utilizó para evaluar los efectos del estrés por frío en la estabilidad de las membranas en las diferentes variedades de granada durante el almacenamiento. Esta técnica mide la liberación de iones, como K^+ , desde las células vegetales al medio circundante, un proceso relacionado con la pérdida de integridad de las membranas celulares bajo condiciones de estrés. Además, este fenómeno puede estar asociado con acumulaciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, en casos extremos, con la muerte celular programada (PCD) (García-Pastor et al., 2020a).

Se extrajeron discos de 5 mm de diámetro de la piel de la granada mediante un sacabocados, utilizando 15 discos de las pieles combinadas de cinco frutos. Estos discos se sumergieron con agitación continua durante 3 horas en unos viales que contenían 0,5 mL de una solución de manitol 0,3 M a temperatura ambiente, y se midió la conductividad del medio utilizando un conductímetro Crison (Metrohm 664). A continuación, estos viales fueron congelados durante 12 h, para ser sometidos, posteriormente, a un tratamiento de 20 minutos a 121 °C en autoclave para esterilizar y liberar el contenido intracelular de los discos, tras lo cual se realizó una segunda medición de conductividad. La fuga de electrolitos se calculó como el porcentaje de la conductividad inicial respecto a la final, y los resultados se expresaron como media \pm ES.

Cuantificación de Fenoles Totales

Se preparó un agente de extracción compuesto por una mezcla de agua y metanol en una proporción de 2:8 v/v, que contenía NaF 2 mM. Se añadieron 15 mL de este agente de extracción a 5 gramos de muestra obtenida de la piel externa e interna de las 5 granadas de cada repetición, y se homogeneizaron mediante el uso de un homogeneizador (Ultraturrax, T18 basic, IKA, Berlín, Alemania) durante 1 minuto con el objetivo de extraer los compuestos fenólicos.

Los extractos fueron agitados durante 1 hora en una bandeja de agitación y posteriormente centrifugados a 10.000 g durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. Finalmente, se separó el sobrenadante, el cual fue utilizado para cuantificar los fenoles totales.

La determinación de los fenoles se realizó por duplicado en cada extracto utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu y siguiendo el método descrito por Sayyari et al. (2011). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de peso fresco, según una recta de calibrado realizada previamente con cantidades crecientes de ácido gálico y se muestran como la media \pm ES de tres repeticiones.

Cuantificación de la Actividad Polifenol Oxidasa

La actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) en la granada se determinó mediante espectrofotometría UV/Vis. Para preparar el extracto enzimático, se usaron 0,2 g de muestra de la parte externa e interna de la corteza de los frutos de la granada, obtenido de una mezcla de los 5 frutos de cada repetición, previamente triturados con N₂ líquido. La muestra se trituró en un mortero con una disolución de 2 mL de tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7,8) que contenía 1% de polivinilpirrolidona (PVP). La mezcla obtenida se centrifugó a 13.000 g durante 15 minutos a 4 °C, separando el sobrenadante que se usó como el extracto enzimático.

La actividad de la PPO se midió mezclando 100 µL del extracto enzimático con tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7) y 600 µL de solución de pirocatecol 100 mM con un volumen final de 3 mL. La reacción se incubó a 25 °C durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 425 nm antes y después de la incubación. Una unidad de actividad PPO se definió como el aumento de 0,01 en la absorbancia por minuto y por g de peso fresco.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media ± ES de tres réplicas. Los datos de las determinaciones analíticas se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). Las fuentes de variación fueron el tiempo de almacenamiento y las variedades de granada. Se calcularon los valores de diferencias significativas (LSD) para examinar si las diferencias entre las diferentes variedades eran significativas a $P < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el paquete de software SPSS v. 17.0 para Windows. Se realizaron correlaciones entre los índices de daños por frío y la fuga de electrolitos en la piel interna y externa, así como entre los índices de daños por frío y el contenido de fenoles o la actividad PPO, ni en la piel interna ni en la externa.

Resultados

Daños por Frío

Los índices de daños por frío, o *chilling injury* (CI), en la superficie externa e interna de la piel de la granada aumentaron durante el almacenamiento, aunque se observaron diferencias significativas entre los cultivares (Figura 1A y 1B). Así, el cultivar Smith mostró una alta susceptibilidad de CI, con puntuaciones de $2,95 \pm 0,15$ y $2,78 \pm 0,06$ para la superficie externa e interna de la piel, respectivamente, después de 15 días de almacenamiento a 2 °C más 2 días a 20 °C, seguido de los cultivares Wonderful y Kingdom con puntuaciones $\approx 3,2$ para CI interno en esta fecha de muestreo (Figura 1A y 1B). Por el contrario, Mollar de Elche, Mollar-100 y

Purple Queen mostraron una menor susceptibilidad de CI con puntuaciones de $\approx 1,5$ y $1,7$ para la piel externa e interna, respectivamente, después de 30 días de almacenamiento a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ más 2 días a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En base a estos resultados, Mollar de Elche, Mollar-100 y Purple Queen podrían agruparse como cultivares poco sensibles los daños por frío y Wonderful, Bigful y Kingdom como muy sensibles, mientras que ACCO tendría una sensibilidad intermedia. Por otro lado, es interesante señalar que las mayores diferencias en la susceptibilidad a los daños por frío entre los cultivares de granada se encontraron después de 30 días de almacenamiento a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ más 2 días a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 1B).

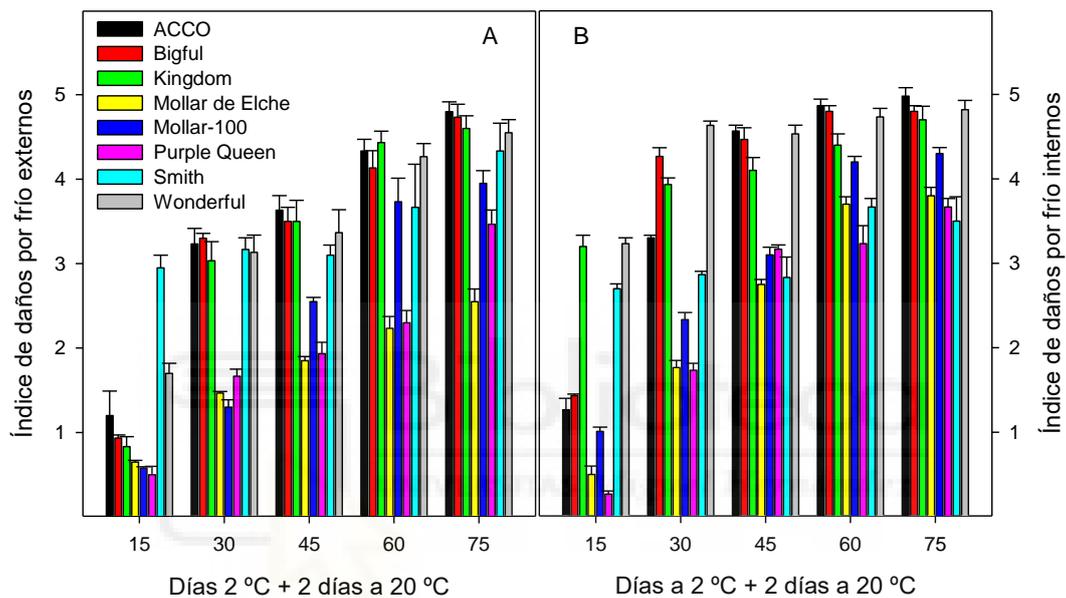


Figura 1. Índice de daños por frío en la piel externa e interna de la granada durante su conservación. Los datos son la media \pm ES de las determinaciones realizadas en tres réplicas de cinco frutos. LSD= 0.15 y 0.13 para las figuras A y B, respectivamente.

Además, cabe destacar que se encontraron correlaciones significativas entre las puntuaciones otorgadas a los daños por frío externos e internos para todos los cultivares, con valores para el coeficiente de determinación (r^2) que oscilaron entre 0,713 y 0,977 para Smith y Mollar de Elche, respectivamente, teniendo en cuenta los datos para todas las fechas de muestreo durante la conservación (Figura 2), indicando una fuerte correlación entre estos dos parámetros.

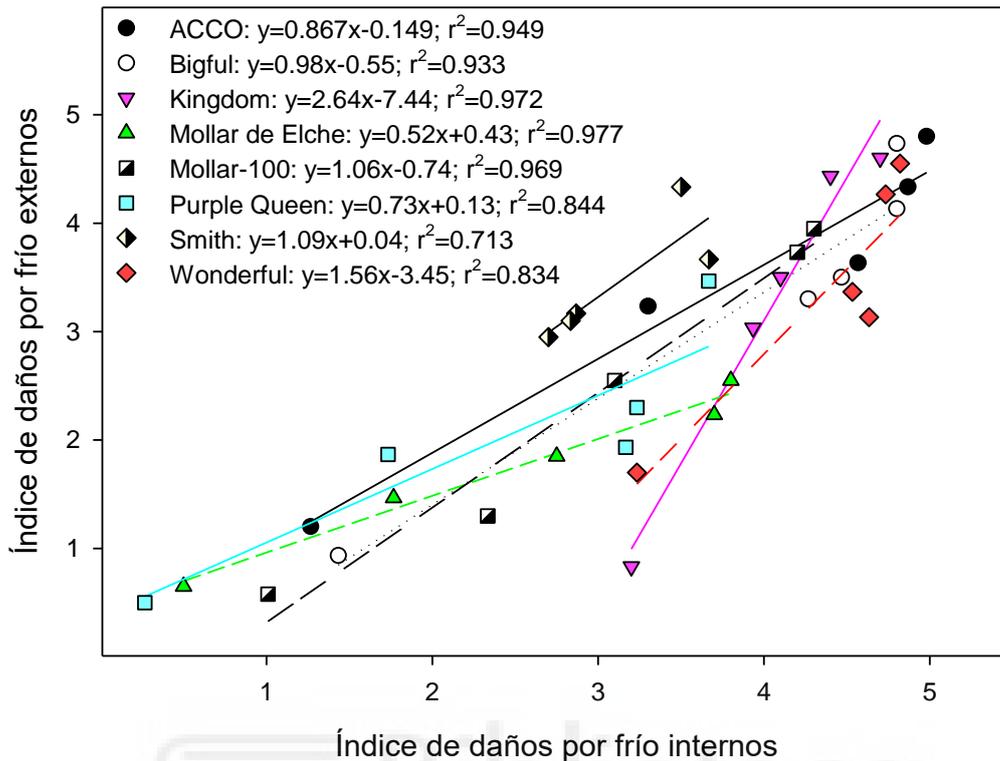


Figura 2. Correlaciones entre los valores de índices de los daños por frío externos e interno, para cada una de las variedades, teniendo en cuenta los datos obtenidos para todas las fechas de muestreo durante la conservación.

Fenoles Totales

La fuga de electrolitos (*Ion Leakage*, IL) aumentó con el tiempo de almacenamiento en todas las variedades analizadas (Figura 3). Las variedades Mollar de Elche y Mollar-100 destacaron por presentar las tasas de IL más bajas, mientras que Bigful y Wonderful mostraron los valores más altos. Por tanto, los datos muestran una respuesta diferencial al estrés prolongado por el almacenaje en frío en las diferentes variedades. Cabe destacar que las mayores diferencias en los valores de IL entre las variedades se encontraron en las muestras de los 30 días de conservación, de la misma manera que ocurría con los valores de CI tanto en la piel externa como en la interna, tal y como se ha expuesto anteriormente. En los muestreos posteriores, la fuga de electrolitos comenzó a igualarse entre las distintas variedades, por ello, las muestras de 30 días de conservación son un punto clave para el análisis comparativo de otros parámetros.

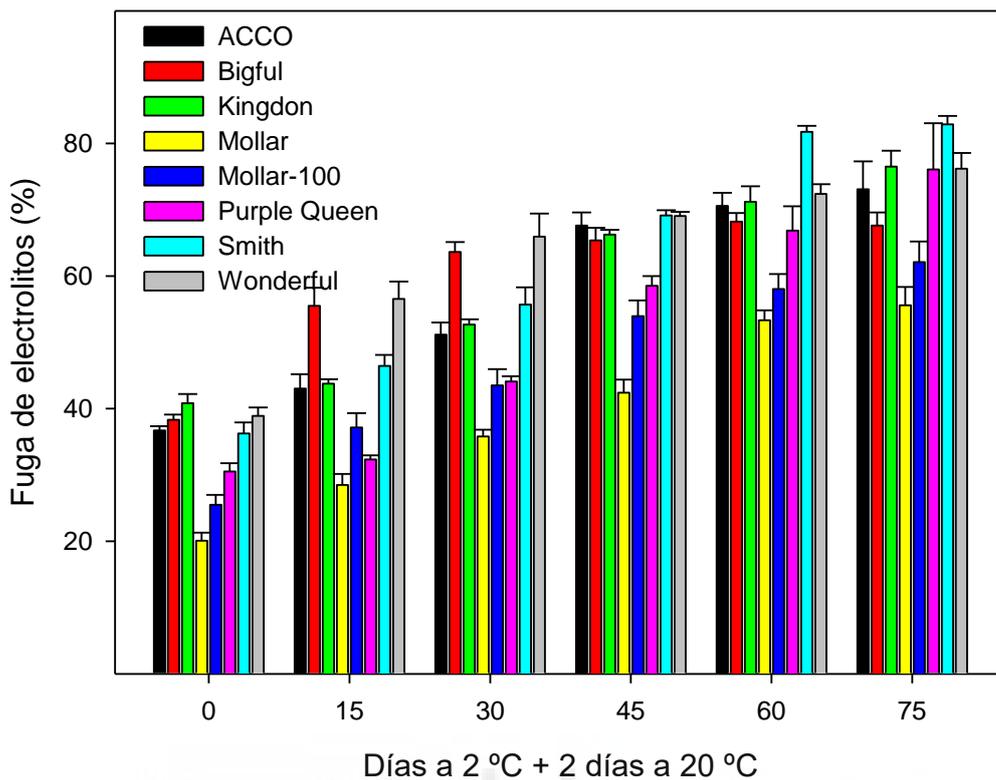


Figura 3. Fuga de electrolitos en la piel de la granada durante su conservación. Los datos son la media \pm ES de las determinaciones realizadas en tres réplicas de cinco frutos. LSD= 1.45.

Los análisis de correlación entre los daños por frío externos y la fuga de electrolitos mostraron valores de r^2 cercanos a 1 para casi todas las variedades (Figura 4), excepto la variedad Smith, que presentó un r^2 cercano a 0,7. Para el daño interno, los coeficientes también fueron cercanos a 1 (Figura 5) en la mayoría de las variedades, mientras que en las variedades Smith y Wonderful, los valores fueron cercanos a 0,8. Sin embargo, todos estos valores indican que existe una fuerte correlación positiva entre los daños por frío, tanto en la piel externa como en la interna, y la fuga de electrolitos en todas las variedades.

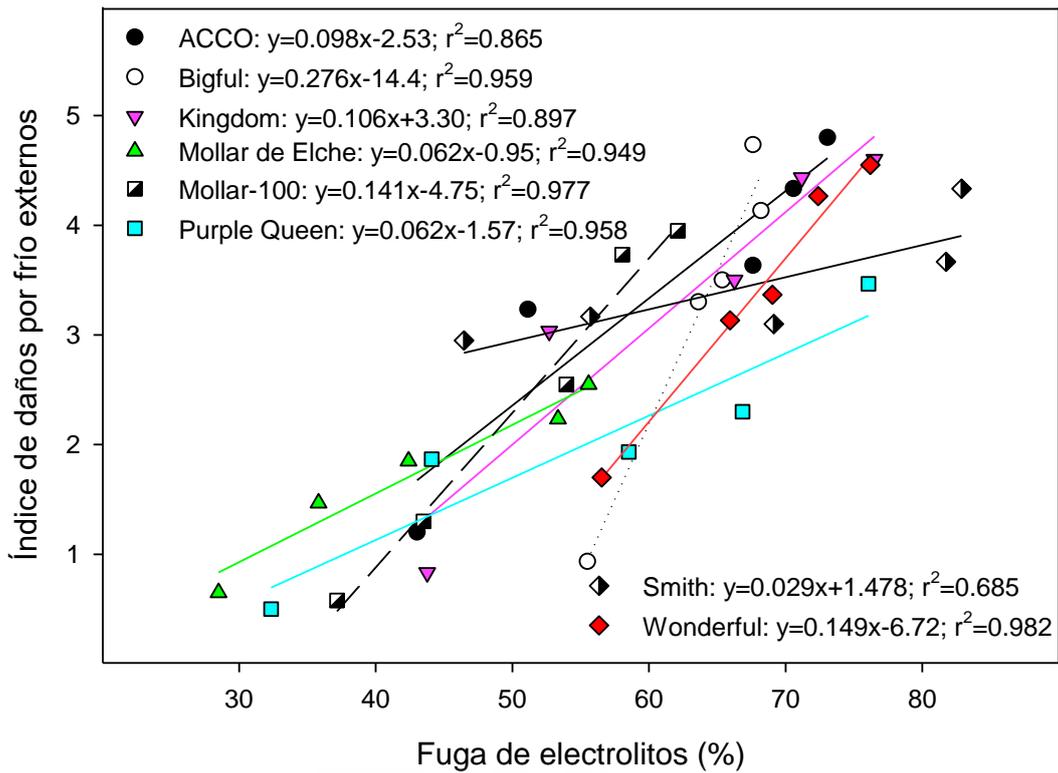


Figura 4. Correlaciones entre los valores de índices de los daños por frío en la piel externa y la fuga de electrolitos, para cada una de las variedades, teniendo en cuenta los datos obtenidos para todas las fechas de muestreo durante la conservación.

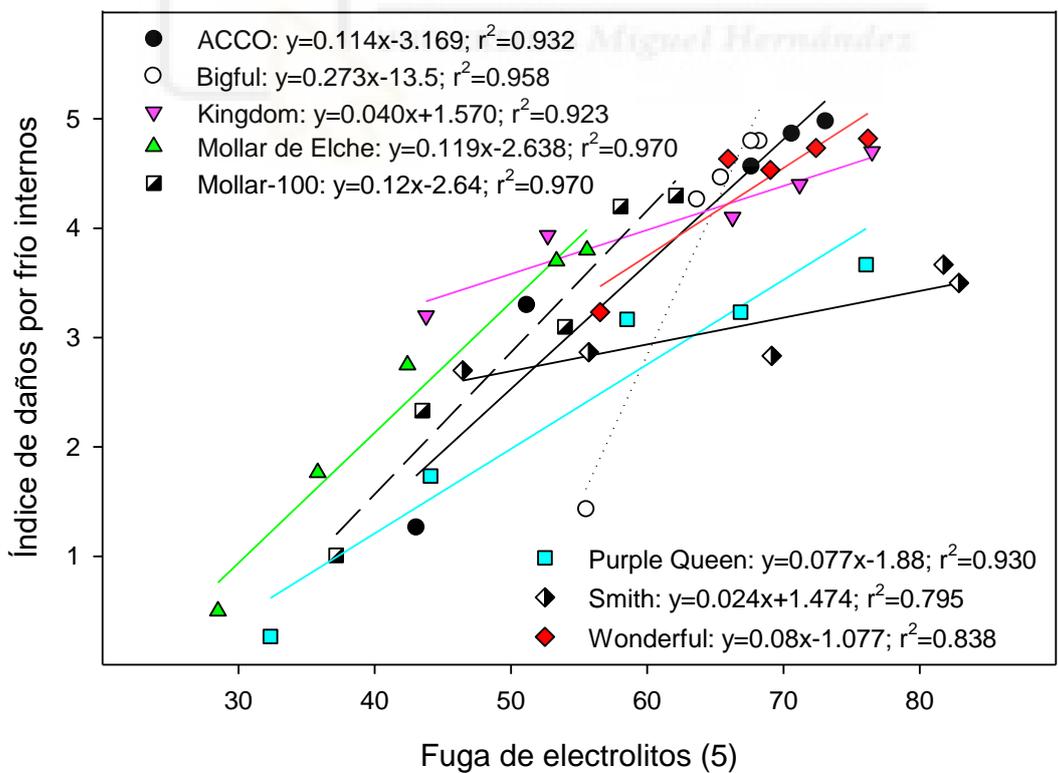


Figura 5. Correlaciones entre los valores de índices de los daños por frío en la piel interna y la fuga de electrolitos, para cada una de las variedades, teniendo en cuenta los datos obtenidos para todas las fechas de muestreo durante la conservación.

Si se tienen en cuenta solo los datos de los 30 días de conservación a 2 °C + 2 días a 20 °C, las correlaciones entre los daños por frío externos e internos y los datos del IL de las diferentes variedades, reveló que el r^2 en la corteza externa fue cercano a 0,7, mientras que en la corteza interna alcanzó valores cercanos a 0,9 (Figura 6). Gracias a esto, se puede confirmar que las muestras del día 30 son esenciales para diferenciar la sensibilidad a los daños por frío de las diferentes variedades de granada. Por ello, estas muestras se seleccionaron para analizar el contenido de fenoles y la actividad polifenol oxidasa (PPO).

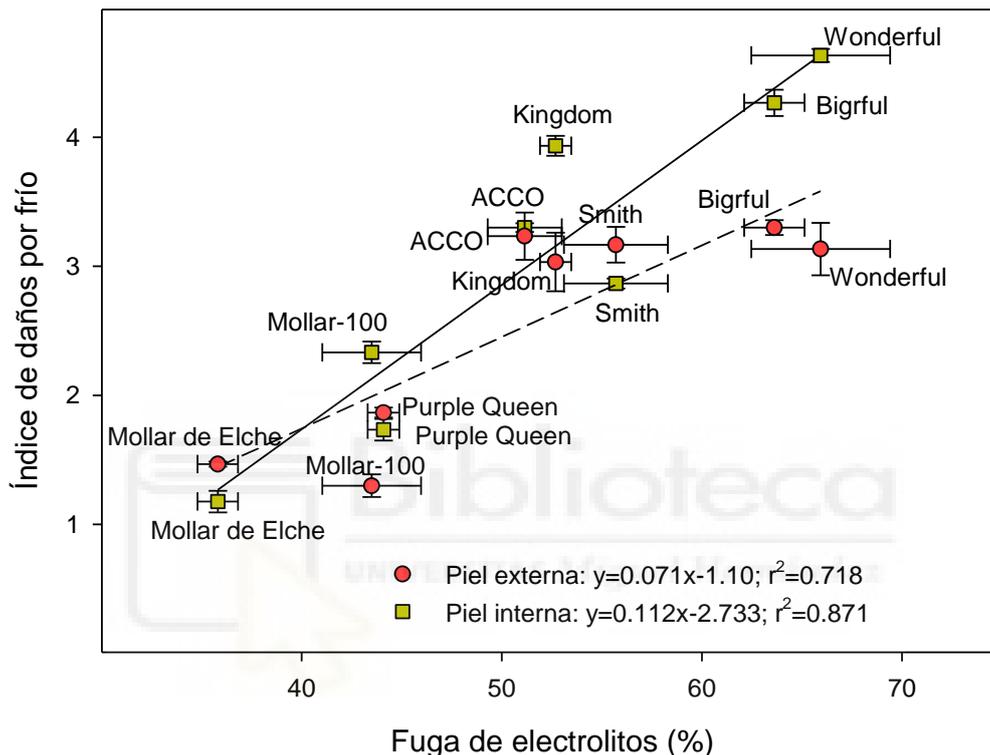


Figura 6. Correlaciones entre los índices de daño por frío en la corteza interna y externa de las diferentes variedades de granada frente la fuga de electrolitos, teniendo en cuenta los datos de los 30 días de almacenaje a 2 °C + 2 días a 20°C.

La concentración de fenoles totales en la corteza interna de la granada fue mayor que la de la corteza externa en todas las variedades analizadas, aunque con valores diferentes dependiendo de la variedad. Así los mayores niveles de fenoles se encontraron en la variedad ACCO, 441 ± 18 y 598 ± 34 mg g⁻¹ en la piel externa e interna, respectivamente, y los menores en la variedad Wonderful, 285 ± 17 y 305 ± 8 mg g⁻¹ en la parte externa e interna de la corteza, respectivamente (Figura 7A). Sin embargo, la actividad PPO fue mayor en la corteza externa que en la interna en todas las variedades, destacando la PPO en la piel externa de la variedad Kingdom, cuya actividad fue de aproximadamente 10.000 U g⁻¹ min⁻¹, unas 5 veces superior a la de la encontrada en la piel interna de las variedades Kingdom y Wonderful que fue inferior a 2.000 U g⁻¹ min⁻¹ (Figura 7B).

Al comparar los niveles de fenoles totales entre ambas partes de las cortezas, se observó una alta correlación, con un r^2 cercano a 0,8 (Figura 8A, Tabla 1). En contraste, al analizar la relación entre la actividad de PPO en la piel externa e interna, el coeficiente de determinación no alcanzó el 0,2 (Figura 8B, Tabla 1). Además, tampoco se encontró correlación entre los índices de daños por frío y el contenido de fenoles o la actividad PPO, ni en la piel interna ni en la externa, con valores de r^2 entre 0.01 y 0,23 (Tabla 1).

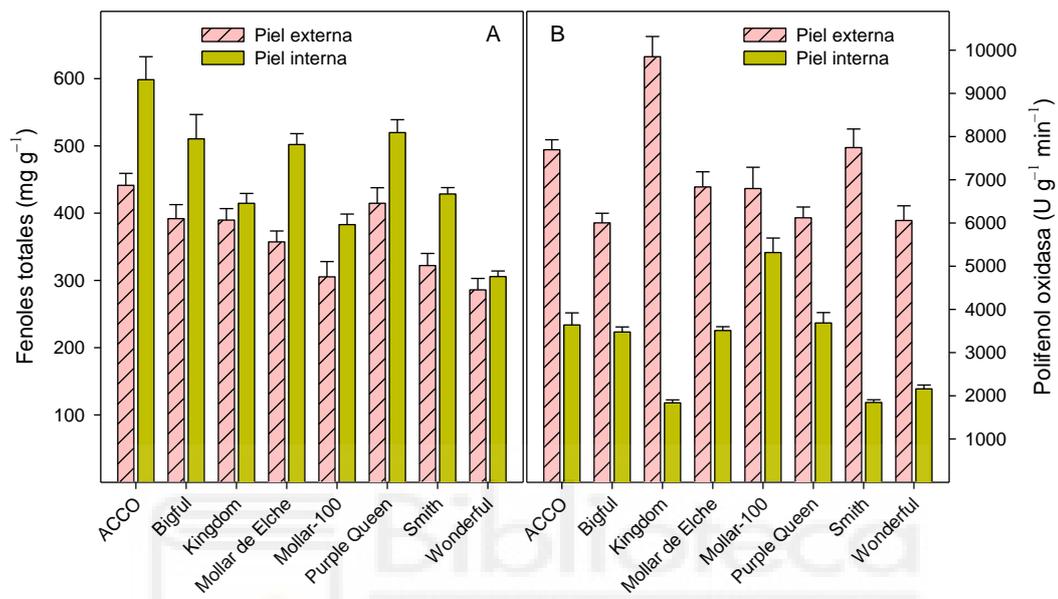


Figura 7. Contenido de fenoles totales (A) y actividad polifenol oxidasa (B) en la piel externa e interna en las diferentes variedades de granada, después de 30 días de almacenaje a 2 °C + 2 días a 20°C. Los datos son la media ± ES de las determinaciones realizadas en tres réplicas de cinco frutos. LSD= 11.26 y 9.37 para la piel externa e interna en la figura A y de 29.04 y 16.34 para la piel externa e interna en Figura B.

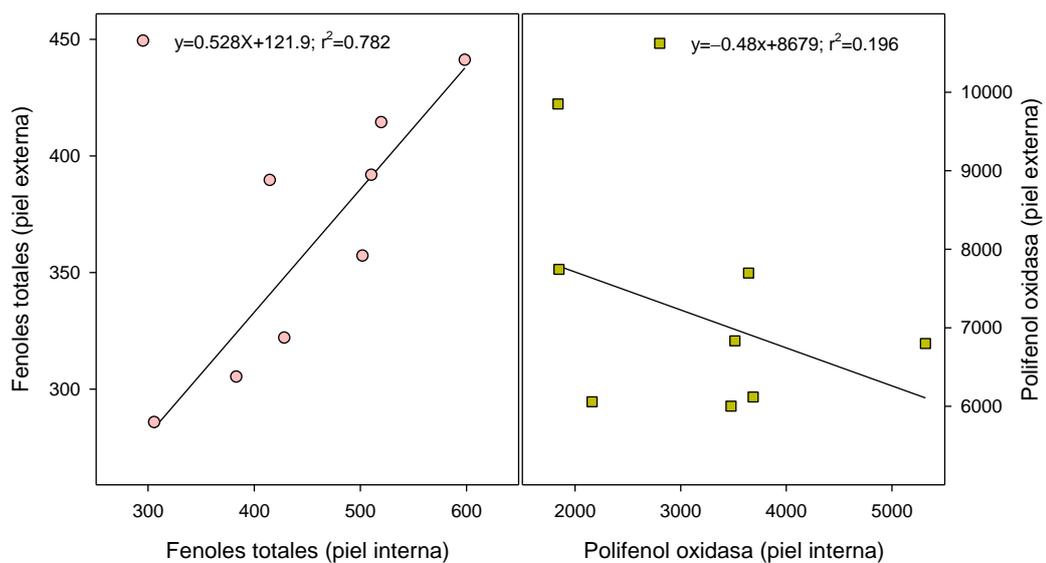


Figura 8. Correlación entre el contenido de fenoles totales de la piel externa e interna (izquierda) y entre la actividad polifenol oxidasa en la piel externa e interna (derecha) teniendo en cuenta los datos de las diferentes variedades después de 30 días de almacenaje a 2 °C + 2 días a 20°C.

Tabla 1. Ecuaciones de correlación y valores de r^2 entre diferentes parámetros en muestras de piel externa e interna de las diferentes variedades de granadas después de 30 días de almacenaje a 2 °C + 2 días a 20 °C.

¹ Parámetros	Ecuación	r^2
CFT en la piel externa vs CFT en la piel interna	$y=0.528x+122$	0.782
PPO en la piel externa vs PPO en la piel interna	$y=-0.48x+8679$	0.196
CI en la piel interna vs CFT en la piel interna	$y=0.005x+5.21$	0.128
CI en la piel externa vs CFT en la piel externa	$y=0.001x+1.97$	0.007
CI en la piel interna vs PPO en la piel interna	$y=0.0005x+4.61$	0.229
CI en la piel externa vs PPO en la piel externa	$y=0.002x+0.88$	0.094

Abreviaciones: CI, daños por frío; CFT, contenido en fenoles totales; PPO, actividad polifenol oxidasa.

Discusión

La temperatura es un factor crucial para controlar la transpiración de los frutos, su actividad metabólica y el desarrollo de microorganismos. Por ello, desempeña un papel fundamental en la conservación de los frutos, permitiendo prolongar su vida útil y mantener su calidad (Rapisarda et al., 2008).

En el caso de la granada, temperaturas por debajo de 5-7 °C pueden provocar daños por frío (*chilling injury*, CI), que se manifiestan como pardeamientos en la superficie externa e interna de la corteza, hendiduras, y en algunos casos, afectan también a las testas. Estos daños, junto con la aparición de podredumbres, como describieron Elyatem & Kader (1984), reducen la calidad del fruto y generan importantes pérdidas económicas.

Este estudio revela que la susceptibilidad al CI varía entre variedades. Las más sensibles son Wonderful y Bigful, seguidas de Kingdom, ACCO y Smith, mientras que Mollar de Elche, Mollar-100 y Purple Queen son más tolerantes. Estas últimas pueden almacenarse a temperaturas más bajas, prolongando su conservación postcosecha y manteniendo una calidad óptima para el consumo. En cambio, las variedades más sensibles deben almacenarse a temperaturas cercanas a 10 °C para evitar daños, aunque esto reduce su tiempo de conservación debido a un metabolismo menos ralentizado.

El daño por frío es un problema fisiológico significativo que se produce al almacenar frutos, como la granada, a bajas temperaturas durante largos períodos. Este fenómeno afecta la estabilidad de las membranas celulares, alterando su permeabilidad y fluidez. Como resultado, tanto las membranas plasmáticas como las de los orgánulos pierden su integridad, lo que provoca fugas de electrolitos y compromete la funcionalidad celular debido a la desintegración progresiva de las membranas en condiciones de frío (Valero y Serrano, 2010).

Estos cambios permiten la difusión de solutos hacia la pared celular, generando un desequilibrio osmótico que desestabiliza los tejidos y contribuye al deterioro del fruto (Vallarino y Osorio, 2019). La fuga de electrolitos (*ion leakage*, IL) es, por tanto, un indicador clave del daño en las membranas celulares. En este estudio, se observó una correlación elevada entre el índice de CI y el IL, tanto en la piel externa como en la interna de las variedades estudiadas.

Estudios previos han indicado que la acumulación de glucosa podría estar vinculada a los mecanismos de defensa que favorecen la tolerancia al estrés por frío (Lorente-Mento et al., 2023). Por otro lado, Liu et al. (2023) encontraron que los cultivares más susceptibles al CI presentan mayores valores de acidez que los más tolerantes. Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados, ya que las variedades más tolerantes (Mollar de Elche, Mollar-100 y Purple Queen) son más dulces que las más sensibles (Wonderful y Bigful).

El contenido de antocianinas en las testas y el de ácidos orgánicos también parecen influir en la susceptibilidad al daño por frío. Los cultivares más sensibles presentan mayores concentraciones de antocianinas, probablemente debido a una alta actividad de enzimas involucradas en su biosíntesis, como la PAL y la flavonoide-3-O-glucosiltransferasa (GT) (Lufu et al., 2023). Esta acumulación podría estar relacionada con una mayor presión osmótica en las vacuolas de las testas en variedades como Wonderful y Kingdom, lo que favorece la difusión de agua y moléculas a través de las membranas alteradas, generando oxidaciones en los tejidos de la corteza interna (Cui et al., 2004; Shiratake y Martinoia, 2007).

El contenido en fenoles, especialmente flavonoides como las antocianinas, también juega un papel importante en la respuesta al daño por frío. Estudios previos sugieren que la migración de polifenoles y flavonoides desde la vacuola al citoplasma, donde se encuentra la PPO, permite la interacción entre enzimas y sustratos antes separados. Esto da lugar a la oxidación de fenoles y a la formación de compuestos pardos, responsables del pardeamiento observado (Jiang et al., 2004; Mishra et al., 2022).

En contraste, las variedades menos sensibles al CI muestran mayor estabilidad en sus membranas celulares, atribuida a una proporción más alta de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos, así como a una mayor actividad de enzimas antioxidantes que reducen el daño oxidativo celular (García-Pastor et al., 2020b; Maghoumi et al., 2023; Zhang et al., 2023).

No obstante, nuestros resultados indican que el índice de CI no está correlacionado con el contenido de fenoles ni con la actividad de PPO, ni en la piel externa ni en la interna. Esto sugiere que el elevado contenido en fenoles totales encontrado en la corteza de las granadas, superior a 300 mg g⁻¹ incluso en las variedades con menor contenido, es tan alto que, al

difundirse al citoplasma celular, la PPO los oxida generando compuestos pardos, los principales síntomas del CI.

Conclusiones y Proyección Futura

Conclusiones

Los resultados de este estudio confirman que la susceptibilidad al daño por frío (*chilling injury*, CI) varía significativamente entre las variedades de granada analizadas. Las variedades Mollar de Elche, Mollar-100 y Purple Queen demostraron una mayor tolerancia al CI, mientras que Wonderful, Bigful y Kingdom fueron las más susceptibles, seguidas por Smith y ACCO, que presentaron una sensibilidad intermedia. Estos hallazgos permiten identificar variedades adecuadas para almacenamiento prolongado en frío, así como aquellas que requieren condiciones menos exigentes.

La fuga de electrolitos (*Ion Leakage*, IL) destacó como un indicador clave del daño causado por el CI, mostrando correlaciones significativas con los índices de CI tanto en la piel externa como en la interna. Sin embargo, no se encontró una correlación directa entre los índices de CI y el contenido de fenoles totales o la actividad de polifenol oxidasa (PPO). Por tanto, la diferente sensibilidad de las variedades de granada al CI no se debe a su contenido en fenoles o a la diferente actividad PPO, sino que podría deberse al mejor mantenimiento de la estructura y funcionalidad de las membranas celulares, posiblemente por su mayor contenido en ácidos grasos insaturados, lo que requiere futuras investigaciones.

Además, el análisis realizado en el día 30 de almacenamiento a 2 °C, seguido de 2 días a 20 °C, se estableció como un punto crítico para diferenciar la sensibilidad al CI entre variedades. Esta etapa permitió realizar una comparación más precisa de los parámetros estudiados, incluyendo el IL, el contenido de fenoles y la actividad PPO, destacando la importancia de este intervalo en futuros análisis comparativos.

Proyección Futura

Este estudio abre varias líneas de investigación y aplicación práctica. En primer lugar, sería relevante validar los resultados obtenidos bajo condiciones comerciales reales de almacenamiento y transporte, con el objetivo de confirmar la aplicabilidad de los hallazgos a escala industrial. Además, la evaluación del efecto de tratamientos postcosecha, como antioxidantes o recubrimientos comestibles, podría ofrecer soluciones efectivas para reducir el daño por frío en variedades susceptibles como Wonderful y Bigful, aumentando así su vida útil y calidad comercial.

Por ello, investigaciones futuras podrían profundizar en los mecanismos moleculares que explican la mayor tolerancia al CI en variedades como Mollar de Elche. Estudios genéticos y bioquímicos centrados en genes relacionados con la síntesis de antioxidantes, la estabilización de membranas y la regulación del estrés oxidativo aportarían información valiosa para programas de mejora genética que prioricen la selección de variedades resistentes al CI y con excelentes características organolépticas.

En el ámbito metodológico, sería interesante desarrollar y estandarizar herramientas más precisas para evaluar el daño por frío, como la imagen hiperespectral o métodos no destructivos. Estas tecnologías podrían mejorar la eficiencia en la detección y clasificación de frutas afectadas por el CI.

Por último, es fundamental investigar estrategias que permitan reducir las pérdidas económicas asociadas al CI, promoviendo prácticas sostenibles que optimicen el almacenamiento y la comercialización, contribuyendo así a un impacto ambiental y económico positivo en el sector.

Bibliografía

1. Arendse, E. (2014). Determining Optimum Storage Conditions for Pomegranate Fruit (cv. Wonderful). *Master's Thesis*, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa.
2. Arendse, E.; Fawole, O.A.; Opara, U.L. (2015). Effects of postharvest handling and storage on physiological attributes and quality of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.): A review. *Int. J. Postharvest Technol. Innov.*, **5**, 13–31.
3. Bassiri-Jahromi, S. (2018). *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncology reviews*, **12**(1). DOI: 10.4081/oncol.2018.345
4. Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. (2020). Controlled abiotic stresses revisited: From homeostasis through hormesis to extreme stresses and the impact on nutraceuticals and quality during pre- and postharvest applications in horticultural crops. *J. Agric. Food Chem.*, **68**, 11877-11879.
5. Cheng, J.; Li, J.; Xiong, R.-G.; Wu, S.-X.; Huang, S.-Y.; Zhou, D.-D.; Saimaiti, A.; Shang, A.; Feng, Y.; Gan, R.-Y. (2023). Bioactive compounds and health benefits of pomegranate: An updated narrative review. *Food Biosci.* **53**, 102629.
6. Cui, S. M.; Sasada, Y.; Sato, H.; Nii, N. (2004). Cell structure and sugar and acid contents in the arils of developing pomegranate fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **73**, 241-243. DOI: 10.2503/jjshs.73.241
7. Elyatem, S. M.; Kader, A. A. (1984). Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. *Scientia Horticulturae*, **24**(3-4), 287-298. DOI: 10.1016/0304-4238(84)90113-4
8. García-Pastor, M.E.; Serrano, M.; Guillén, F.; Giménez, M.J.; Martínez-Romero, D.; Valero, D.; Zapata, P.J. (2020a). Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate ‘Mollar de Elche’ at harvest and during postharvest storage. *J. Sci. Food Agric*, **100**, 145–153.
9. García-Pastor, M.E.; Serrano, M.; Guillén, F.; Zapata, P.J.; Valero, D.; (2020b). Preharvest or a combination of preharvest and postharvest treatments with methyl jasmonate reduced

- chilling injury, by maintaining higher unsaturated fatty acids, and increased aril colour and phenolics content in pomegranate. *J. Postharvest Technol. Innov.*, 167. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2020.111226
10. Hess-Pierce; Kader, A.A. (2003). Responses of 'Wonderful' pomegranates to controlled atmospheres. *Acta Horti*, **600**, 751–757.
 11. Jiang, Y.; Duan, X.; Joyce, D.; Zhang, Z.; Li, J. (2004). Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chemistry*, 88(3), 443-446. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.004
 12. Johanningsmeier, S.D.; Harris, G.K. (2011). Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology* 2:181–201
 13. Kader, A.A. (2006). Postharvest biology and technology of pomegranates. *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*, 1st ed. CRC Press, 211–220.
 14. Kashash, Y.; Doron-Faigenboim, A.; Holland, D.; Porat, R. (2019). Effects of harvest time on chilling tolerance and the transcriptome of 'Wonderful' pomegranate fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **147**, 10-19.
 15. Lansky, E.P.; Newman, R.A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 177–206.
 16. Liang, S.-m.; Kuang, J.-f.; Ji, S.-j.; Chen, Q.-f.; Deng, W.; Min, T.; Shan, W.; Chen, J.-y.; Lu, W.-j. (2020). The membrane lipid metabolism in horticultural products suffering chilling injury. *Food Qual. Saf*, **4**, 9–14. DOI: 10.1093/fqsafe/fyaa001
 17. Lorente-Mento, J.M.; Carrión-Antolí, A.; Guillén, F.; Valero, D.; Serrano, M.; Martínez-Romero, D. (2023). Relationship among Sugars, Organic Acids, Mineral Composition, and Chilling Injury Sensitivity on Six Pomegranate Cultivars Stored at 2 °C. *Foods*. **12**(7). DOI: 10.3390/foods12071364.
 18. Lufu, R.; Ambaw, A.; Opara, U.L. (2023). Determination of moisture loss of pomegranate cultivars under cold and shelf storage conditions and control strategies. *Sustainable Food Technology*, **1**, 79-91. DOI: 10.1039/D2FB00017B
 19. Maghoumi, M.; Amodio, M.L.; Cisneros-Zevallos, L.; Colelli, G. (2023). Prevention of Chilling Injury in Pomegranates Revisited: Pre-and Post-Harvest Factors, Mode of Actions, and Technologies Involved. *Foods*. **12**. DOI: 10.3390/foods12071462.
 20. Maghoumi, M.; Amodio, M.L.; Fatchurrahman, D.; Cisneros-Zevallos, L.; Colelli, G. (2022a). Pomegranate Husk Scald Browning during Storage: A Review on Factors

- Involved, Their Modes of Action, and Its Association to Postharvest Treatments. *Foods*, **11**, 3365.
21. Maghoumi, M.; Fatchurrahman, D.; Amodio, M.L.; Quinto, M.; Cisneros-Zevallos, L.; Colelli, G. (2022b). Is pomegranate husk scald during storage induced by water loss and mediated by ABA signaling? *J. Sci. Food Agric*, **103**, 2914–2925.
 22. MAPA Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022). *Superficies y Producciones Anuales de Cultivos*; Estadísticas Agrarias 2022; Gobierno de España: Madrid, Spain.
 23. Melgarejo, P.; Martínez-Nicolás, J.J.; Núñez-Gómez, D.; Almansa, M.S.; Legua, P.; (2024). Accurate Botanical Nomenclature: Pomegranate and the ‘Aril’ Misconception. *Foods*. **13**, 201. DOI: 10.3390/foods13020201.
 24. Melgarejo-Sánchez, P.; Núñez-Gómez, D.; Martínez-Nicolás, J.J.; Hernández, F.; Legua, P.; Melgarejo, P. (2021). Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: A review. *Bioresour. Bioprocess*, **8**, 2.
 25. Meerts, I.A.T.M.; Verspeek-Rip, C.M.; Buskens, C.A.F.; Keiser, H.G.; Bassaganya-Riera, J.; Jouni, Z.E.; Van Huygevoort, A.H.B.M.; Van Otterdijk, F.M.; Van De Waart, E.J. (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food and Chemical Toxicology*. **47**(6), 1085-92. DOI: 10.1016/j.fct.2009.01.031
 26. Mishra, V.; Kaplan, Y.; Ginzberg, I. (2022). Mitigating chilling injury of pomegranate fruit skin. *Sci. Hortic*, **304**, 111329. DOI: 10.1016/j.scienta.2022.111329
 27. Montefusco, A.; Durante, M.; Migoni, D.; De Caroli, M.; Ilahy, R.; Pék, Z.; Helyes, Z.; Fanizzi, F.P.; Mita, G.; Piro, G.; Lenucci, M.S. (2021). Analysis of the Phytochemical Composition of Pomegranate Fruit Juices, Peels and Kernels: A Comparative Study on Four Cultivars Grown in Southern Italy. *Plants*, **10**, 2521. DOI: 10.3390/plants10112521
 28. Moradinezhad, F.; Ranjbar, A. (2023). Role of Plant Growth Regulators and Eco-Friendly Postharvest Treatments on Alleviating Chilling Injury and Preserving Quality of Pomegranate Fruit and Arils: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*, **December**. DOI: 10.1007/s00344-023-11189-4
 29. Pareek, S.; Valero, D.; Serrano, M. (2015) Postharvest biology and technology of pomegranate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **95**, 2360–2379. DOI: 10.1002/jsfa.7069
 30. Patel, B.; Tandel, Y.; Patel, A.H.; Patel, B.L. (2016). Chilling injury in tropical and subtropical fruits: A cold storage problem and its remedies: A review. *Int. J. Sci. Environ. Technol*, **5**, 1882–1887.

31. Rapisarda, P.; Bellomo, S.E.; Fabroni, S.; Russo, G. (2008). Juice quality of two new mandarin-like hybrids (*Citrus clementina* Hort. ex Tan x *Citrus sinensis* L. Osbeck) containing anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 56(6):2074-8. DOI: 10.1021/jf072616e. Epub 2008 Feb 26. PMID: 18298061.
32. Shiratake, K.; Martinoia, E. (2007). Transporters in fruit vacuoles. *Plant Biotechnology*, **24**, 127-133. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.24.127
33. Stiletto, A.; Trestini, S. (2021). Factors behind Consumers' Choices for Healthy Fruits: A Review of Pomegranate and Its Food Derivatives. *Agric. Econ*, **9**, 31.
34. Tozzi, F.; Legua, P.; Martínez-Nicolás, J.J.; Núñez-Gómez, D.; Giordani, E.; Melgarejo, P. (2020). Morphological and nutraceutical characterization of six pomegranate cultivars of global commercial interest. *Scientia Horticulturae*, **272**. DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109557
35. Valdenegro, M.; Fuentes, L-; Bernales, M.; Huidobro, C.; Monsalve, L.; Hernández, I.; Schelle, M.; Simpson, R. (2022). Antioxidant and Fatty Acid Changes in Pomegranate Peel with Induced Chilling Injury and Browning by Ethylene During Long Storage Times. *Frontiers in Plant Science* March. DOI: 10.3389/fpls.2022.771094
36. Valero, D.; Serrano, M. (2010). Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality (1st ed.). *CRC Press*. DOI: 10.1201/9781439802670
37. Vallarino, J. G.; Osorio, S. (2019). Organic acids. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 207-224. DOI: 10.1016/B978-0-12-813278-4.00010-5
38. Zhang, H.; Pu, J.; Liu, H.; Wang, M.; Du, Y.; Tang, X.; Luo, X.; Wang, Y.; Deng, Q. (2023). Effects of L-cysteine and γ -aminobutyric acid treatment on postharvest quality and antioxidant activity of loquat fruit during storage. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**(13), 10541. DOI: 10.3390/ijms241310541