

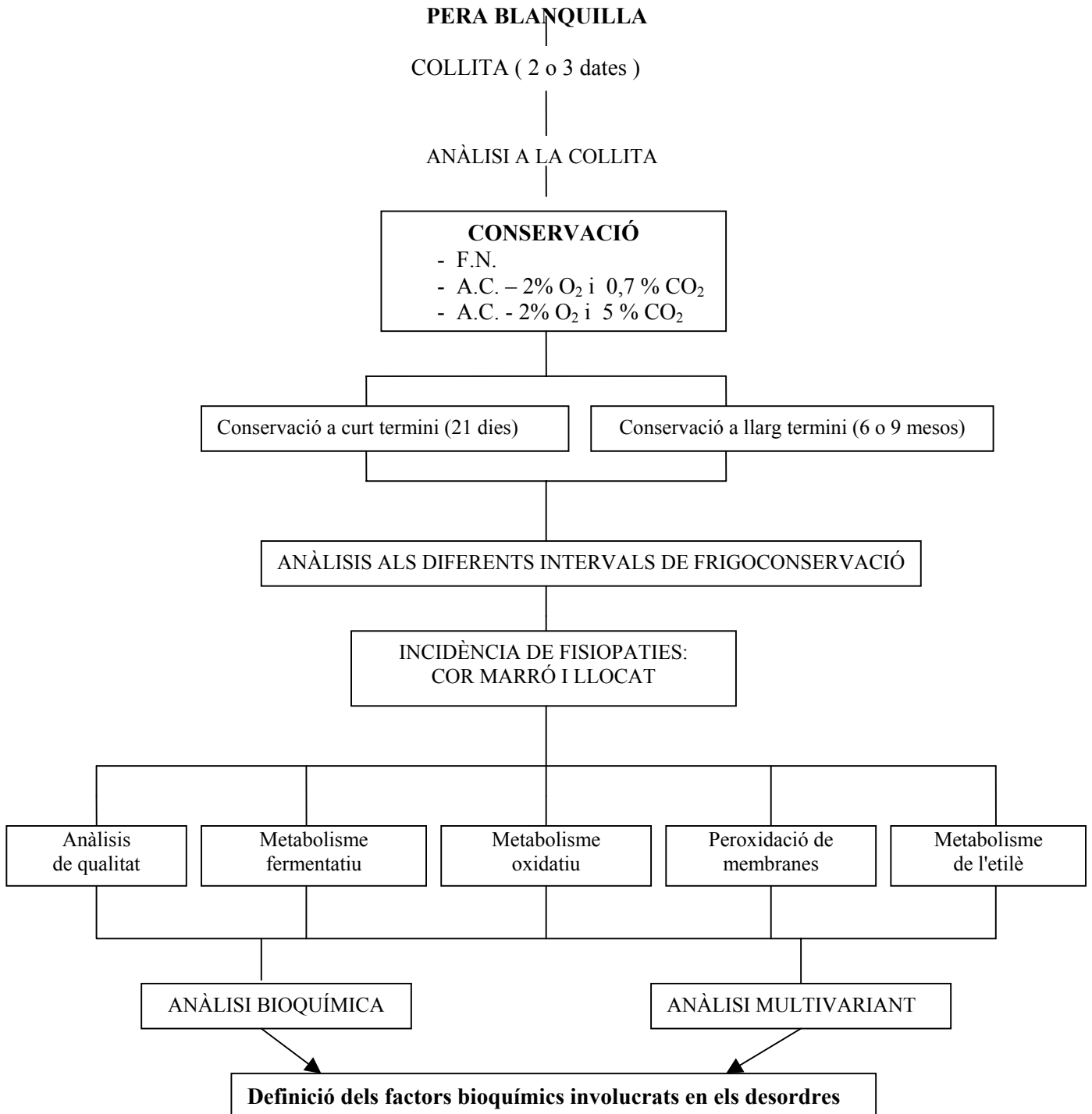
---

## II . PLA DE TREBALL I METODOLOGIA

---

## 1.- PLA DE TREBALL

L'estudi s'ha realitzat durant tres campanyes fructícoles, des de l'agost (collita) fins al mes de maig de l'any següent (final de conservació), en una varietat de gran interès comercial per a la zona, la pera Blanquilla. Per a la realització dels objectius anteriorment esmentats es va seguir el següent pla de treball (Figura 1).



**Figura 1.-** Esquema del pla de treball. Els detalls sobre les anàlisis es detallen a continuació.

- **Localització i inici de l'estudi**

El present estudi va ser dut a terme en una parcel·la experimental situada al terme municipal d'Albatàrrec, en la comarca del Segrià, província de Lleida; des de l'agost de l'any 1997 fins al juliol del 2000.

- **Material vegetal**

Es van utilitzar peres de la varietat Blanquilla (*Pyrus communis* cv. *Blanquilla*). Les característiques de la plantació eren les següents:

- Any de plantació: 1980.
- Patró o porta-empelt: franc.
- Sistema de formació: vas.
- Marc de plantació: 5 x 2,5 m.

- **CAMPANYA FRUCTÍCOLA 1997 – 1998**

Dates de recol·lecció: 28 / 7 / 1997 (collita comercial)

5 / 8 / 1997 (collita tardana, per una major incidència de fisiopaties)

Atmosferes de conservació:

Cambres experimentals de 22m<sup>3</sup> a (-0,5)°C de temperatura i 92% HR amb tres tipus d'atmosferes diferents:

- Fred normal
- AC de baix CO<sub>2</sub> : 2 ± 0,5% O<sub>2</sub> i 0,7 ± 0,3% CO<sub>2</sub>
- AC d'alt CO<sub>2</sub> : 2 ± 0,5% O<sub>2</sub> i 5 ± 0,5% CO<sub>2</sub>

Període de conservació:

El temps de conservació va ser de sis mesos amb sortides de cambra cada 2 mesos, és a dir, als 2, 4 i 6 mesos de conservació.

Determinacions analítiques:

Les anàlisis es van dur a terme a la recol·lecció i a cada sortida de cambra per a cada collita. Els paràmetres analitzats van ser els següents:

- 1.- Incidència i severitat de la descomposició interna i del cor marró.
  - Mostreig de 200 fruits per atmosfera de conservació i data d'anàlisi.
  - Resultats expressats com a percentatge de fruits alterats i com a percentatge de teixit alterat.
- 2.- Paràmetres de qualitat.
  - Pes i calibre
  - Color de l'epidermis
  - Fermesa
  - Acidesa
  - Sòlids solubles
- 3.- Paràmetres bioquímics.
  - Metabolisme oxidatiu: SOD, CAT, POX i APX.
  - Metabolisme fermentatiu: ADH, PDC, acetaldehid i etanol.
  - Metabolisme de peroxidació de membranes: LOX, età, MDA i conductimetria.

## • CAMPANYA FRUCTÍCOLA 1998 – 1999

Dates de recol·lecció: 4 / 8 / 1998 (collita comercial + 3 dies)  
11 / 8 / 1998 (collita tardana)

### Atmosferes de conservació:

Cambres experimentals de 22m<sup>3</sup> a (-0,5)°C de temperatura i 92% HR amb tres tipus d'atmosferes diferents:

- Fred normal
- AC de baix CO<sub>2</sub> : 2 ± 0,5% O<sub>2</sub> i 0,7 ± 0,3% CO<sub>2</sub>
- AC d'alt CO<sub>2</sub> : 2 ± 0,5% O<sub>2</sub> i 5 ± 0,5% CO<sub>2</sub>

### Període de conservació:

El temps de conservació va ser de nou mesos. Aquest va ésser dividit en dos períodes, la conservació a curt termini i la conservació a llarg termini. La primera es va allargar fins a 21 dies després de la collita i incloïa sortides de cambra als 7, 13 i 21 dies. L'estudi de llarga conservació es va dur a terme als 3, 6 i 9 mesos de frigoconservació.

### Determinacions analítiques:

Les anàlisis es van dur a terme a la collita i en conservació frigorífica tant a curt com a llarg termini per la segona collita. A més, també es va fer una caracterització dels fruits sans i dels fruits alterats i pel que fa a aquests últims es va fer la determinació per a cada índex. Es van establir cinc índexs que es corresponien amb uns determinats percentatges d'alteració. Els paràmetres analitzats van ser els següents:

- 1.- Incidència i severitat de la descomposició interna i del cor marró.
  - Igual que la campanya anterior.
- 2.- Paràmetres de qualitat.
  - Igual que la campanya anterior però, a més es va analitzar el gradient de pH existent entre el cor i la polpa.
- 3.- Paràmetres bioquímics.
  - Metabolisme oxidatiu: { Enzims protectors: SOD, CAT, APX, GR  
Antioxidants: àcid ascòrbic i glutatió
  - Metabolisme fermentatiu: ADH, PDC, acetaldehid i etanol.
  - Metabolisme de peroxidació de membranes: LOX, età, MDA, estat de peroxidació i conductimetria.
  - Efecte protector: poliamines.

## • CAMPANYA FRUCTÍCOLA 1999 – 2000

Dates de recol·lecció: 29 / 7 / 1999 (collita primerenca)  
5 / 8 / 1999 (collita comercial + 3 dies)  
12 / 8 / 1999 (collita tardana)

### Atmosferes de conservació:

Cambres experimentals de 22m<sup>3</sup> a (- 0,5)°C de temperatura i 92% HR amb dos tipus d'atmosferes diferents:

- AC de baix CO<sub>2</sub> :  $2 \pm 0,5\%$  O<sub>2</sub> i  $0,7 \pm 0,3\%$  CO<sub>2</sub>
- AC d'alt CO<sub>2</sub> :  $2 \pm 0,5\%$  O<sub>2</sub> i  $5 \pm 0,5\%$  CO<sub>2</sub>

Període de conservació:

El temps de conservació va ser de sis mesos amb sortides de cambra cada 2 mesos, és a dir, als 2, 4 i 6 mesos de conservació.

Determinacions analítiques:

Les anàlisis es van dur a terme a la recol·lecció i a cada sortida de cambra. En les sortides solament es van analitzar la segona i la tercera collita. També es va fer la caracterització dels fruits sans i alterats mitjançant els paràmetres següents.

1.- Incidència i severitat de la descomposició interna i del cor marró.

- Igual que la campanya anterior.

2.- Paràmetres de qualitat.

- Igual que la campanya anterior, però es va determinar també el contingut en clorofil·les "a" i "b".

3.- Paràmetres bioquímics

- Metabolisme oxidatiu: 

{	Enzims protectors: SOD, CAT, POX
	Cicle ascorbat-glutatió: APX, MDHAR, DHAR, GR, AAO, NAD i NADH
	Antioxidants: AA reduït i oxidat i glutatió
- Metabolisme fermentatiu: acetaldehid i etanol.
- Metabolisme de peroxidació de membranes: LOX i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Metabolisme de l'etilè: ACC i MACC.

## 2.- METODOLOGIA

La metodologia analítica corresponent a les determinacions bioquímiques és detallada en l'apartat de Resultats, el qual és presentat en forma d'articles científics. Cadascun dels mètodes d'anàlisi és descrit a la secció de Material i Mètodes de cada article. En la part d'anàlisi estadística, es descriu de forma breu el mètode que majoritàriament s'ha utilitzat per a la interpretació dels resultats obtinguts. Aquest mètode ha estat l'anàlisi multivariant o quimiomètrica, que s'ha dut a terme amb el programa Unscrambler 6.11b (Camo AS. Ed., 1996), que ha permès donar una visió complementària a l'obtinguda prèviament amb el programa SAS 6.11.

### 2.1.- L'anàlisi multivariant o quimiomètrica

L'anàlisi multivariant, també anomenada quimiomètrica, és un mètode estadístic que permet estudiar de forma conjunta i simultània tots els paràmetres que defineixen o determinen qualsevol fenomen. Per tant, aquesta tècnica és complementària als mètodes clàssics univariants.

Qualsevol estudi es caracteritza per un conjunt de dades que contenen informació sobre la propietat que es vol determinar o estudiar. Això es pot expressar com que hi ha una relació modelable entre el grup de variables mesurades i la propietat que ens interessa. Matemàticament, es formula dient que la propietat que es vol estudiar (generalment

anomenada Y) és funció de les variables mesurades (anomenades X). La variable Y generalment resulta ser una mesura més cara o difícil d'obtenir, mentre que les variables X són més fàcils d'obtenir i/o més barates. En el nostre estudi, la variable Y és el percentatge d'alteració que presenten les mostres, mentre que les X són tota la resta de variables.

Les mesures que es fan sempre contenen elements que són irrellevants per a la propietat que es cerca. Així, el valor d'una observació pot ser dividit en dues parts ben diferenciades: l'estructura de les dades, que és la part correlacionada amb la propietat objecte d'estudi, i el "soroll", que és quelcom diferent. Aquí és on entra en escena l'anàlisi multivariant, que s'empra per separar ambdues parts.

### **2.1.1.- Objectius principals de les tècniques multivariants**

L'anàlisi multivariant és emprada en un gran nombre d'estudis. Es poden dividir els objectius d'aquesta anàlisi en tres grans blocs:

1. Descripció o caracterització de les dades: una gran part de l'anàlisi multivariant està relacionada amb la simple observació de les dades, caracteritzant-les d'alguna forma. Un mètode freqüentment utilitzat per dur a terme aquesta caracterització és l'Anàlisi per Components Principals (P.C.A.).
2. Regressió i predicció: la regressió és una aproximació per a relacionar dos grups de variables entre ells. Això correspon a determinar una (o unes) variables Y prenent com a base les variables X. D'altra banda, la predicció significa determinar valors d'Y en nous objectes basats en el model X prèviament estimat.
3. Discriminació i classificació: la discriminació es basa en la separació o diferenciació de grups de dades en funció de la propietat objecte d'estudi. La classificació és semblant, però en aquest cas ja es coneix abans de l'anàlisi quins grups són rellevants.

### **2.1.2.- Passos previs: el pretractament de les dades i els outliers**

Abans de començar amb el tractament pròpiament dit de les dades, sovint cal efectuar-ne un pretractament consistent en una sèrie d'operacions prèvies per tal d'eliminar les diferències que puguin existir entre les dades.

Estandardització: consisteix a escalar o "pesar" les dades. El factor més emprat a l'hora d'escalar les dades és multiplicar per la inversa de la desviació estàndard. Aquest tractament és molt útil quan es tenen variables definides en diferents unitats, així es garanteix que cada variable escalada tingui la mateixa variància.

Centrat: consisteix a restar la mitjana aritmètica a les dades.

Autoescalat: operació resultant de la combinació de les operacions de centrat i escalat de les dades.

Aquestes operacions prèvies també inclouen l'eliminació d'aquelles mostres atípiques pel model, les quals s'anomenen outliers i portarien a una mala interpretació dels resultats. Una forma de detectar els possibles outliers és mitjançant el diagrama dels residuals de les mostres o mitjançant el diagrama de scores.

### 2.1.3.- L'anàlisi per components principals

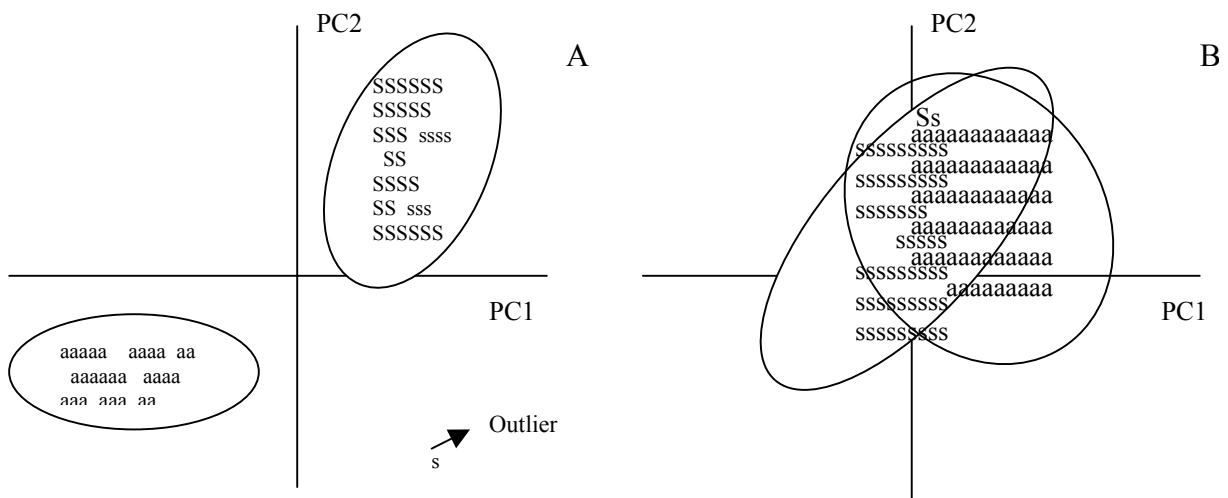
El mètode d'Anàlisi per Components Principals (P.C.A.) consisteix a reduir el número de variables i facilitar la interpretació de la matriu de dades mitjançant tècniques de visualització (Esbensen *et al.*, 1994). Aquesta matriu de dades, matriu X, està formada per  $n$  mostres i  $p$  variables-X, representada en un sistema cartesià ortogonal de dimensió  $p$ . L'anàlisi per components principals parteix d'assumir que la variable més important és la que presenta màxima variància, és a dir, aquella respecte de la qual les mostres prenen valors més diferents.

S'anomena Primer Component Principal (PC1), a l'eix determinat per la direcció de màxima variància en el conjunt de dades. Sovint el conjunt de punts no és tan simple com per ser modelat amb un únic PC; cal pensar, doncs, en el Segon Component Principal (PC2), el qual discorrerà en una direcció ortogonal al primer PC (Johson i Wichern, 1998). Així successivament, s'anirien trobant la resta de Components Principals, els quals identificarien les variables en el nou espai de representació. Progressivament, els últims PC's es poden prendre com a direccions de "soroll". Aquesta és la idea de com el P.C.A. pot descompondre la matriu X original en la part estructural i en la part de "soroll".

Un dels avantatges d'aquesta anàlisi és el fet de reduir la dimensionalitat de l'espai a poques components, les noves variables, (els PCs). Això permet l'ús de diagrames bidimensionals o tridimensionals, que són els únics que es poden representar per a la seva visualització i interpretació: el diagrama de scores i el diagrama de loadings.

#### 2.1.3.1.- El diagrama de scores

Permet representar les mostres en un subespai definit per uns determinats PC's. El diagrama de scores més emprat és el de PC1 vs. PC2., ja que són els Components Principals que donen una major dispersió (variància) de les mostres. Ara bé, si la variància explicada fos massa baixa, generalment es procedeix a estudiar els diagrames PC1 vs. PC $i$ , on "i" anirà des de 2 fins al nombre màxim de PC's. Aquest gràfic ens permet caracteritzar les mostres entre si i respecte als PC's. Les mostres properes són semblants i les allunyades diferents. A continuació i per tal d'ajudar a la interpretació d'aquests gràfics, es presenten dos exemples de diagrames de scores (Figura 2).

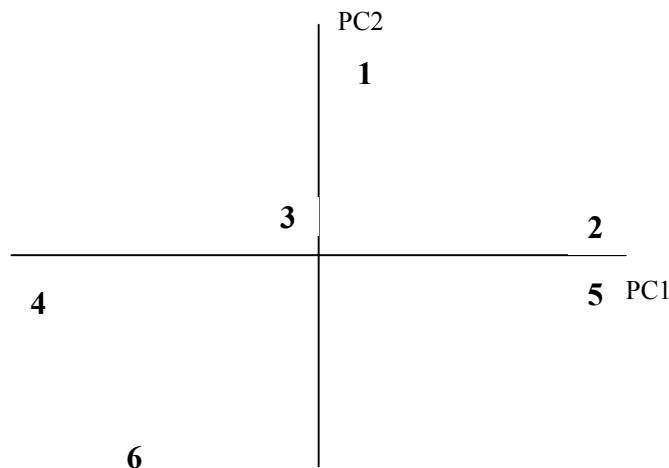


**Figura 2.-** Diagrames de scores PC1 vs PC2 de dos matrius de dades diferents. (A) Les mostres es separen en clusters o grups diferenciats. (B) Les mostres no es diferencien entre si.

La figura 2A presenta una situació amb dos grups de mostres o clusters clarament diferenciats. Alhora, les mostres de dins d'un cluster són molt similars entre si. Hi ha una mostra molt diferent de tota la resta, aquesta és un outlier. En canvi, la figura 2B presenta un model que no permet separar les mostres, bé perquè el número de PC's és insuficient o bé perquè les mostres són similars entre si. El següent pas és estudiar el diagrama de loadings conjuntament amb el de scores, pels mateixos components o PC's.

### 2.1.3.2.- El diagrama de loadings

Representa les variables en el subespai esmentat anteriorment. Aquest permet identificar els PC's amb una o més d'una variable estudiada, ja que els loadings representen el pes (importància) de cadascuna de les variables respecte a cada PC. Variables que apareixen properes a l'origen de coordenades no tenen importància en la definició d'aquests PC's. També es pot veure com covarien les variables entre si. És també d'especial interès relacionar els diagrames de loadings amb els diagrames de scores corresponents, ja que es relacionen així les mostres amb les variables en funció de la zona del diagrama en la qual es troben. A més, ens ajudarà a determinar quines variables són responsables de les similituds o diferències entre mostres. A continuació, es presenta un exemple de diagrama de loadings (Figura 3).



**Figura 3.-** Exemple de diagrama de loading PC1 vs. PC2.

A partir de la figura anterior, es poden interpretar les següents relacions entre variables. Les variables 2 i 5 presenten una alta correlació positiva i les variables 2 i 4 tenen una alta correlació negativa. Les variables 1 i 6 estan negativament correlacionades, però la variable 6 es correlaciona amb la variable 4 a través del component PC1. La variable 3 no pot ésser interpretada en aquest gràfic perquè està situada molt a prop del centre d'aquest.

Un altre diagrama molt útil en aquesta anàlisi és el diagrama de la variància residual del model respecte al nombre de PC's, el qual ens permet obtenir l'òptim número de PC's. Aquest és un concepte fonamental, ja que si es consideren pocs PC's, la interpretació del model corre el risc d'ésser superficial i incompleta; d'altra banda, emprant massa components també s'arriba a interpretacions errònies, ja que llavors s'interpreta part del "soroll" de les dades.



### 2.1.4.- La regressió multivariant

Aquesta part de l'anàlisi determina la relació de les dues matrius de dades, X i Y, mitjançant la regressió. La relació resultant o model serà emprada posteriorment per a fer futures prediccions, ja que la predicció és la segona fase de la regressió.

Els mètodes de regressió que es poden utilitzar són els següents: la regressió multilinear (MLR), la regressió per components principals (PCR) i la regressió per mínims quadrats parcials (PLSR); aquesta última és la que utilitzarem en el nostre estudi.

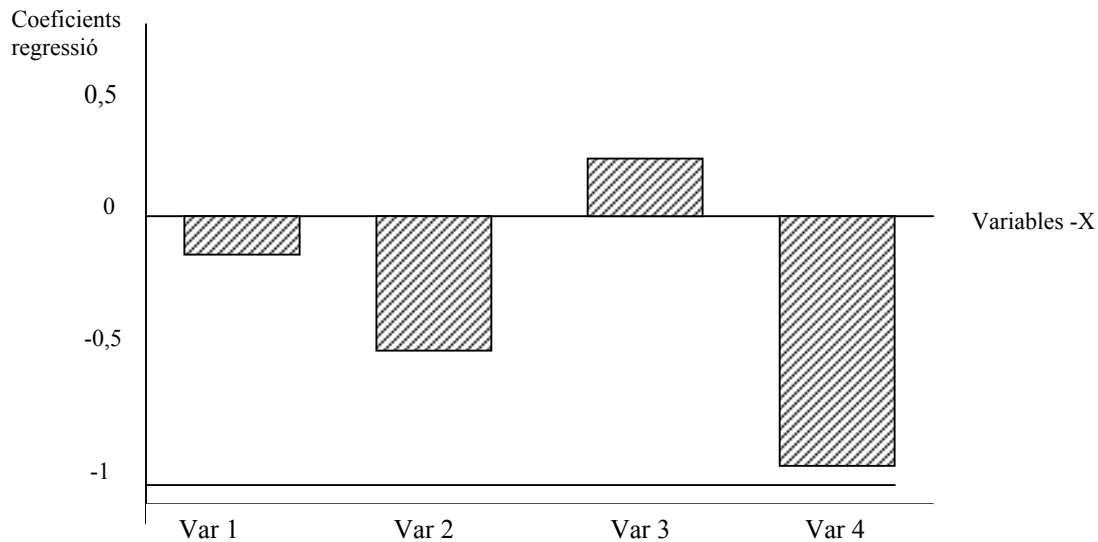
La idea fonamental de la regressió per mínim quadrats parcials o mètode PLS és que empra la informació continguda en Y per a trobar l'estructura rellevant d'Y en les dades X. En conseqüència, amb una anàlisi PLS, es poden obtenir els mateixos resultats de predicció que amb un anàlisi PCR, però amb un menor nombre de PC's (De Jong, 1993).

Hi ha dues versions de PLS: PLS-1, que modela únicament una variable Y; i PLS-2, que modela diverses variables Y simultàniament. En el nostre estudi s'utilitzarà un PLS-1.

Posteriorment, s'ha de validar el model. És a dir, es tracta de testar l'habilitat del model per a la predicció dels nous valors de la variable Y a partir d'un nou conjunt de dades X. Hi ha diversos mètodes de validació, però es prefereix el de *full cross validation*, que, tot i ser més costós de realitzar, és el més real en les seves determinacions.

Els diagrames usats més habitualment per interpretar una anàlisi mitjançant un PLS, són els següents: el diagrama de loadings, el diagrama de valors predits vs. valors mesurats i el diagrama dels coeficients de regressió.

- El diagrama de loadings: representa el conjunt de les variables X i de les variables Y. Indica la variància en X necessària per a explicar una determinada variància en Y per cada PC.
- Valors predits vs. valors mesurats: presenta els valors de les mostres predits pel model respecte als valors mesurats d'aquestes. És útil per a testar la qualitat de l'ajustament del model de regressió a les dades. Es presenten juntament amb el diagrama, una sèrie d'estadístics per a comprovar el comportament del model de predicció; entre els més importants cal assenyalar el R.M.S.E.P i el coeficient de correlació.
  - R.M.S.E.P: *Root Mean Square Error of Prediction*. És l'error que podem esperar en futures prediccions. Es mesura amb les mateixes unitats que la variable per predir.
  - Coeficient de correlació: ens indica el percentatge de correlació entre els valors predits i els valors mesurats.
- Coefficients de regressió: Quantifica la importància que té cada variable X en futures prediccions de la variable Y. Valors absoluts grans per una determinada variable indiquen que aquesta és important en la predicció de la variable Y i, valors petits (propers a zero) indiquen que la variable no té importància en la predicció. Més concretament, ens indica l'increment en la variable-Y quan la corresponent variable-X s'ha incrementat una unitat, mantenint la resta de variables constant. A continuació, es presenta un exemple de diagrama de coeficients de regressió per tal de facilitar-ne la seva interpretació (Figura 4).



**Figura 4.-** Diagrama dels coeficients de regressió per les variables-X per un determinat nombre de PC's.

De la figura anterior, se n'extreu que les variables 1 i 3 estan poc relacionades amb la variable-Y. En canvi, la variable 4 està fortament anticorrelacionada amb la variable estudiada. Concretament, un increment d'una unitat en la variable 4 suposa un increment negatiu de 0,9 unitats en la variable-Y.

### 2.1.5.- La classificació

En aquest estudi, abans de començar el tractament de les dades ja es coneixen quins són els dos grups a diferenciar, el dels fruits sans i el dels fruits alterats, per tant parlarem de classificació i no pas de discriminació.

El principal objectiu de la classificació és assignar noves mostres a cadascuna de les classes o grups existents, però alhora permet trobar quines són les variables que defineixen o identifiquen cadascun dels grups, així com aquelles que permeten discriminar entre grups.

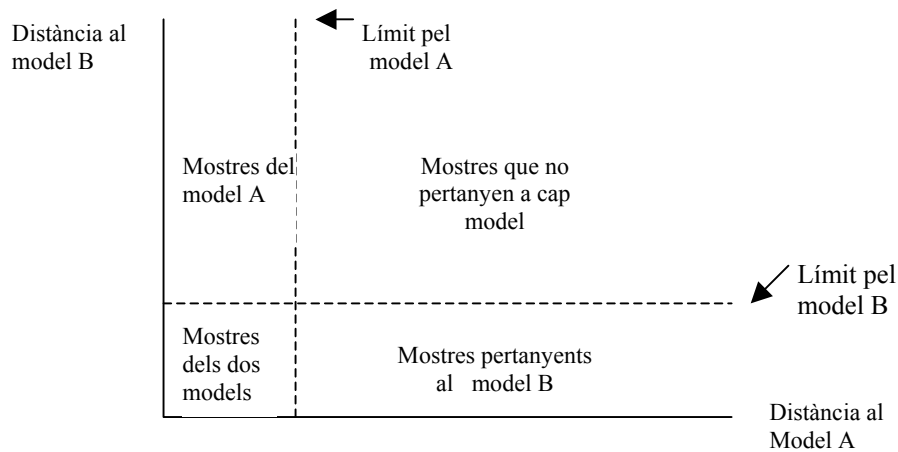
Les dues fases en què es divideix la classificació són:

1. El modelatge, que consisteix a definir un model PCA per a cada classe.
2. La classificació de noves mostres, que consisteix a assignar, si és possible, cada mostra a una de les classes existents.

Els resultats de la classificació són estudiats en funció dels diagrames següents:

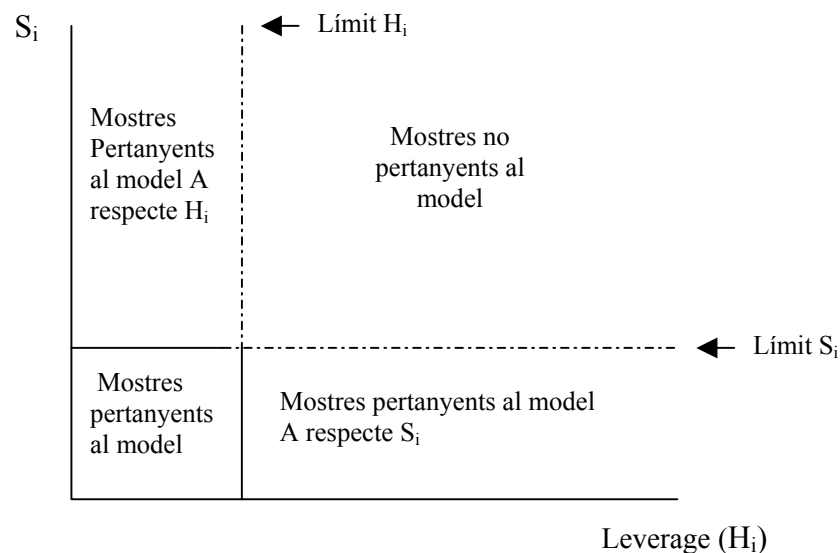
- Distància entre models: indica com de diferents són els models entre si. Una distància entre models superior a 3, ens indica que les classes són significativament diferents entre elles, la qual cosa implicarà, en principi, que les mostres poden ser classificades.
- Poder de modelatge: mesura la influència de cada variable per a definir cadascun dels models. Variables amb valors inferiors a 3 tenen poca importància en el model.

- Poder de discriminació: indica l'habilitat d'una variable per a discriminar entre dos models. Variables amb valors superiors a 3 poden ser considerades importants per a diferenciar entre ambdós models.
- Gràfic de Cooman's: representa gràficament a quina classe o grup pertanyen les mostres, en funció de  $S_i$  (distància al model). Les mostres per a un nivell de significació donat, l'habitual és un 5%, poden pertànyer a un o altre model, als dos a la vegada o bé a cap d'ells. En la figura 5, es representa un exemple d'aquest gràfic en el qual, es mostren els límits per a cada classe.



**Figura 5.-** Diagrama de Cooman's per les classes A i B per un nivell de significació donat (5%).

- Gràfic  $S_i$  vs  $H_i$ : és una eina molt més precisa per a la classificació que no pas l'anterior, ja que aquesta es duu a terme en funció de  $S_i$  i  $H_i$  (*leverage*, distància al centre del model). Cadascuna de les classes es representa mitjançant un gràfic on es poden visualitzar els dos paràmetres de la classificació. En la figura 6, es representa un exemple d'aquest gràfic per a la classe A.



**Figura 6.-** Diagrama  $S_i$  vs  $H_i$  pel model A per un nivell de significació del 5% i per un determinat nombre de PC's.

## Referències

CAMO, AS., 1996. *The Unscrambler (version 6.11)*. Camo AS, Trondheim.

DE JONG, S. 1993. PLS fits closer than PCR. *Journal of Chemometrics*, 7: 551-557.

ESBENSEN, K., MIDTGOARD, T., SCHÖNKOPF, S., 1994. *Multivariate Analysis en Practice*. Camo, AS. Ed, Trondeheim, Norway.

JOHSON, RA., WICHERN, DW., 1998. *Applied multivariate statistical analysis*, Prentice-Hall, 607p.

---

## III . RESULTATS

---

# **Capítol 1**

---

## **Involvement of oxidative processes in the development of core browning in controlled-atmosphere stored pears**

C. LARRIGAUDIÈRE<sup>1</sup>, E. PINTÓ<sup>1</sup>, I. LENTHERIC<sup>1</sup>, M. VENDRELL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro UdL-IRTA, CeRTA, Area de Post-collita, Rovira Roure, 177, 25198 Lleida, Spain

<sup>2</sup>CSIC, Centro de Investigación y Desarrollo, Jorge Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

Publicat en:

**Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 76(2), 157-162. 2001**

## **Capítol 2**

---

### **Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears**

E. PINTÓ<sup>1</sup>, I. LENTHERIC<sup>1</sup>, M. VENDRELL<sup>2</sup>, C. LARRIGAUDIÈRE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro UdL-IRTA, CeRTA, Area de Post-collita, Rovira Roure, 177, 25198 Lleida, Spain

<sup>2</sup>CSIC, Centro de Investigación y Desarrollo, Jorge Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

Publicat en:

**Journal of the Science of Food and Agriculture, 81: 364-370. 2001**

---

## III . RESULTATS

---



---

# BIOCHEMICAL CHARACTERISATION OF CORE BROWNING AND BROWN HEART DISORDERS IN PEAR BY MULTIVARIATE ANALYSIS

C. Larrigaudière <sup>1</sup>, I. Lentheric <sup>1</sup>, J. Puy <sup>2</sup> and E. Pintó <sup>1</sup>

<sup>1</sup>: UdL-IRTA, CeRTA, Postharvest Unit, Alcalde Rovira Roure, 191 - 25198 Lleida, Spain.

<sup>2</sup>: University of Lleida, Department of Chemistry, Alcalde Rovira Roure, 191  
25198 Lleida, Spain.

**ABSTRACT.** In this work multivariate analysis was used to characterise and differentiate two important post harvest disorders that occurred in pear during storage: brown heart (BH) and core browning (CB). Damage percentage for each kind of disorder was correlated with the length of storage, storage CO<sub>2</sub> concentration and activity of the enzymes involved in fermentative and oxidative metabolism. The first characterisation of samples (PCA model) clearly distinguished two groups: healthy and damaged fruits. Within the damaged group, the model also clearly discriminated between fruits with brown heart and those with core browning. In this scheme, core browning appeared first, during storage and brown heart later. To complement these first results, a PLS model that quantified the importance of each variable in predicting the disorder percentage was also established. According to this model, core browning mainly correlated with the fermentative enzyme alcohol dehydrogenase (ADH), whereas brown heart correlated with the antioxidant enzymes ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT). Collectively, these results show that core browning and brown heart are two different disorders that involve different metabolic pathways.

**Key words:** brown heart, core browning, fermentative enzymes, antioxidant enzymes, principal component analysis, partial least squares.

## INTRODUCTION

Today about 80% of the world's pears are stored under controlled atmosphere (CA) conditions. The application of high-CO<sub>2</sub> and low-O<sub>2</sub> concentrations inhibits ripening and ethylene production and consequently extends the storage life of many fruits (Artés, 1995).

However, CA can also damage fruit. For example, pears (*Pyrus communis* cv. Blanquilla) can be affected by core browning (CB) or brown heart (BH) during storage (Herrero, 1986; Bertolini et al., 1987; De la Plaza, 1986). These disorders are characterised by an alteration of first the core and later the flesh. In the case of core browning, flesh breakdown may extend to the rest of the fruit, with a zone of about 1 cm below the skin remaining unaffected. In the case of brown heart, lesions usually dry out to form large cavities in the flesh. To date, it has remained unclear whether CB and BH are the product of one single disorder or two different ones. Late harvesting and high-CO<sub>2</sub> storage increase the incidence of both disorders (Roelofs and De Jager, 1997). Climatic factors are also important (Luton and

Holland, 1986), and incidence of the disorders is significantly reduced when CA is delayed (Roelofs and De Jager, 1997).

Little is known about what causes these disorders. The main factor appears to be a combination of low temperature and excessive CO<sub>2</sub> concentrations during storage. In these conditions, alcohol and acetaldehyde accumulate and have a toxic effect on the fruit (Pesis et al., 1988). CA storage may also cause the accumulation of active oxygen species (AOS) such as O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Prasad et al., 1994; Larrigaudière et al., 2001a). These compounds are particularly reactive and may indiscriminately cause lipid peroxidation and protein denaturation (Halliwell and Gutteridge, 1989). This may give rise to membrane disintegration and cellular decompartmentalisation, resulting in turn, in the leakage of phenolic compounds from the vacuole and in the initiation of browning (Veltman et al., 1999a). Plants have several enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence mechanisms to counteract such damage. Among their non-enzymatic antioxidants, ascorbic acid (AA) plays an important role in the destruction of free radicals, while glutathione is essential for the regeneration of ascorbate. Falls in ascorbate are often associated with reduced capability to prevent oxidative damage (Noctor and Foyer, 1998) and may also be related to increases in physiological disorders (Veltman et al., 1999b). Falls in ascorbate are also a common feature of plant senescence (Borracino et al., 1994); for some authors browning initiates when AA levels drops below a certain threshold (Eccher-Zerbini et al., 2002). The enzymatic antioxidant system involves a wide range of enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX) all play important roles in the formation and degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) are both involved in ascorbate regeneration.

The question remains as to whether BH and CB are associated with the same disorder or with two different disorders. The argument for different disorders is supported by the fact that symptoms frequently appear separately: it is common to see pears with only one kind of symptom, flesh breakdown or cavities. On the other hand, a putative link between CB and BH is generally accepted. According to this hypothesis, the lesions formed during CB dry out are responsible for forming large cavities in the flesh.

The main aim of this study was to answer to this question. The second aim was to determinate the specific role of antioxidant and fermentative metabolism in each disorder.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Plant material***

Pears ( *Pyrus communis* cv Blanquilla ) were harvested in the Lleida area (NE Spain) at commercial maturity according to local recommendations (firmness, sugars and acidity values). Research was carried out in summer 1999 with 18-year-old trees. Fruits were picked free of defects, in a randomised design and from three-tree units. After harvest, fruits were stored in experimental chambers for periods of three (S1) and six months (S2) at -1°C and 92% RH. Chamber characteristics were as follows: (a): control storage conditions (cam7, 2% O<sub>2</sub> + 0.7% CO<sub>2</sub>) and (b): disorder-inducing storage conditions (cam5, 2% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>).

### ***Estimation of internal disorders***

After 3 and 6 months of storage, pear samples (n=200) were cut longitudinally and transversally in order to examine the incidence of CB and BH. Severity symptoms for each disorder were scored using a classification in which: **t0** = healthy fruits, **t1** = fruits with core browning, **t2** = fruits with brown heart, **g0** = healthy or slightly damaged fruits (< 20%), **g1** = sharply damaged fruit ( $\geq 20\%$ ) and **%alt** = % of damaged area.

### ***Extraction and assays of fermentation enzymes***

Protocols were carried out according to Ke et al. (1994). For each replicate (n=6), 20 g of tissue were homogenised in 40 ml of 100 mM 2-(n-morpholino) ethane sulphonic acid (MES) buffer (pH 6.5) containing 5 mM dithiothreitol and 5 % (w/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). The homogenate was filtered through two layers of cheesecloth and centrifuged at 27000 g for 10 min. The supernatant was retained as enzyme extract for measuring pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH) activities (Ke et al., 1994).

### ***Extraction of enzymes involved in antioxidant metabolism***

Pulp tissue (20 g fresh weigh) was ground in liquid nitrogen with a pestle and mortar and homogenised in 60 ml 0.1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 2 mM DTT, 5 % (w/v) polyvinylpolypyrrolidone (Bailey et al., 1996). The homogenate was filtered through two layers of miracloth and centrifuged at 20000 g for 15 min. A 2.5 ml aliquot was then loaded into a Sephadex G-25 column (PD 10, Pharmacia) equilibrated with 10 ml 0.1 mM phosphate buffer (pH 7.8). The enzymes were eluted with 3.5 ml of the same buffer. The resulting supernatant was used as an enzyme extract for the determination of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities.

Ascorbate peroxidase (APX) was extracted as described by Biemelt et al. (1998). Pulp tissue was homogenised in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.0, 5 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM AsA and 5 % PVPP. The extract was centrifuged at 15000 g for 15 min and passed through a Sephadex G-25 column (PD 10, Pharmacia) as described above. For extraction of glutathione reductase (GR), the pulp tissue was homogenised in 2 ml g<sup>-1</sup> fresh weight of 100 mM potassium phosphate (pH 7.8) buffer containing 1 % PVPP (w/v), 1 mM EDTA and 1 mM sodium ascorbate (Aono et al., 1995). After filtration, the extract was centrifuged at 15000 g for 15 min and passed through a Sephadex G-25 column (PD 10, Pharmacia) as described above.

### ***Assays of the enzymes involved in antioxidant metabolism***

The SOD activity was assayed by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) according to the Giannopolitis and Ries (1977) method. One unit of SOD was considered to be the amount of enzyme that inhibited NBT reduction by 50 %. Catalase activity was measured by the Clairbone (1985) method, following the decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content at 240 nm. Activity was expressed as the quantity of enzyme responsible for changes in absorbance of 1 min<sup>-1</sup>.

APX activity was determined spectrophotometrically. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM ascorbic acid, and 1 mM

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ascorbic concentration was determined following the decrease in absorbance at 290 nm (Nakano and Asada, 1981).

GR Activity was determined by monitoring the GSSG-dependent oxidation of NADPH at 340 nm and 25°C according to the Foyer and Halliwell (1976) protocol. Reaction mixtures consisted of 0.5 mM GSSG, 0.05 mM NADPH, 2 mM EDTA, 0.1 M Tris, pH 7.8 and an aliquot of the enzymatic extract. NADPH was added last in order to start the reaction.

### ***Extraction and analysis of lipoxygenase***

Fresh pulp (10 g FW) was homogenised with 40 ml of 0.1 mM potassium phosphate (pH 7.5). The homogenate was then centrifuged at 20000 g for 15 min. The supernatant was used as enzyme extract. Lipoxygenase (LOX) activity was assayed spectrophotometrically according to the Surrey (1964) method.

### ***Chemometrics***

Chemometric methods include procedures for multivariate data analysis. These are increasingly used in problems in which groups need to be differentiated, especially when large data sets are involved. In this work, a principal component analysis (PCA) was used to establish a preliminary relationship between internal disorders and the parameters studied in this work. Partial least square regression (PLSR) was also used to quantify this correlation. Unscrambler v.6.11b software was used (Camo AS.ed., 1996) for these determinations.

The data set included two categories of variables identifying storage conditions (cam7 and cam5), three categories relating to the length of storage (S0, S1 and S2), two categories for healthy and damaged fruits (g0 and g1) and three categories for identifying the type of disorder (t0, t1 and t2). These variables were codified using a discrete value that was given a value of +1 when the sample was included in the category and -1 when it was not. Quantitative variables corresponded to enzymatic data for ADH, PDC, SOD, CAT, APX, GR, LOX and the predicted variable to the percentage of disorder (% alt). The resulting data matrix contained 72 samples and 18 variables. As variables were measured in different units, there were large differences between them with respect to the mean, variance and standard deviation. To solve this problem, the data were centred (by subtracting the mean) and weighted with the inverse of the standard deviation before applying PC models.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***Full-data PCA model***

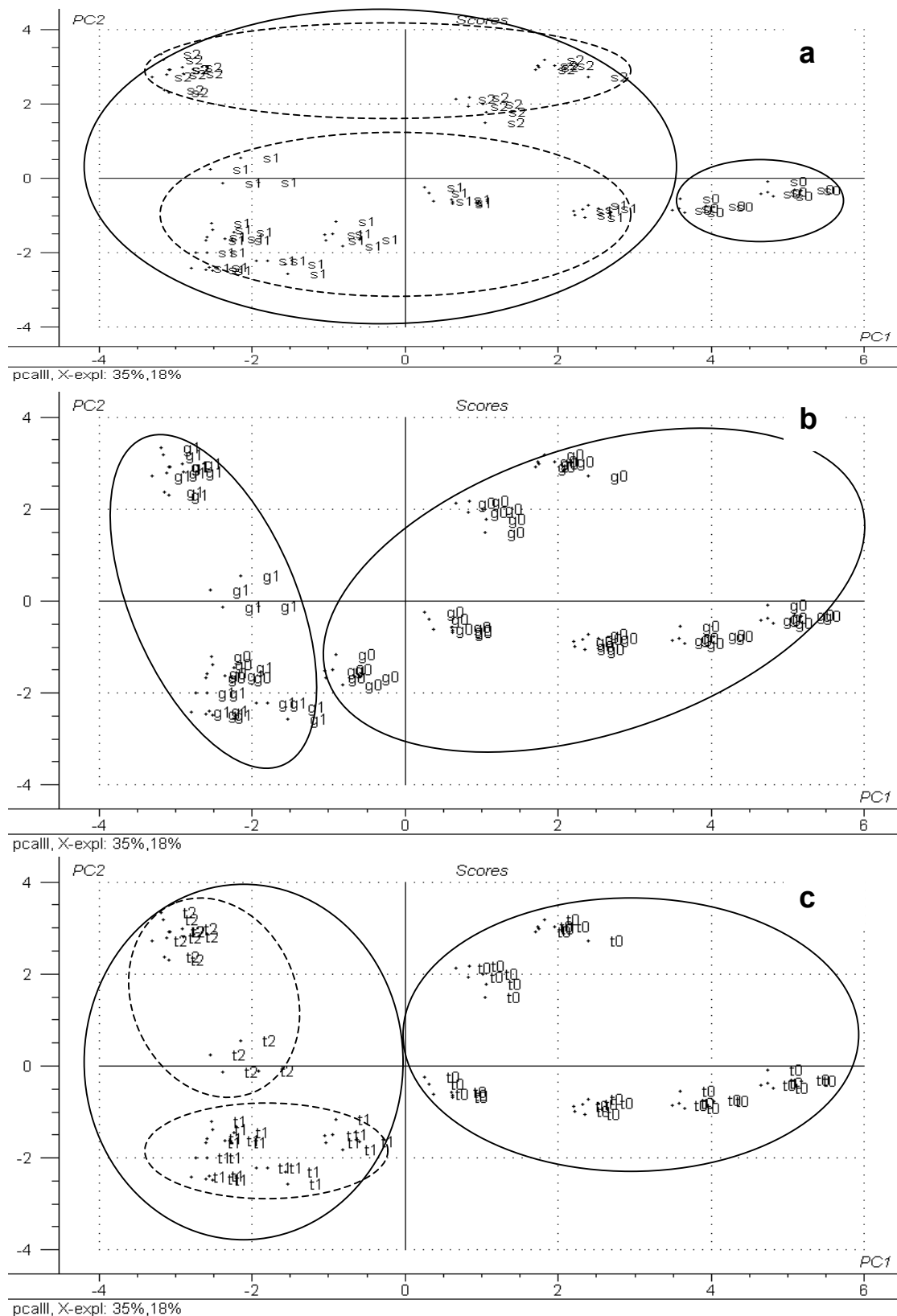
A principal component analysis (PCA) was used to obtain a global overview of the samples. This multivariate technique processed the main information on a limited number of variables, called PC1 and PC2 (Esbensen K., et al., 1994). The score plot of PC1 vs. PC2 from the full-data PCA model is presented in figure 1, and the loading plot of PC1 vs. PC2 in figure 2. The two PC1 and PC2 factors in the resulting model described 53% of the total variance in the data (Figure 1, footnote). This percentage was not very high, because ten category variables with values of -1 and +1 were introduced into the data. However, this value seemed sufficient to define a good model, especially for qualitative purposes.

The first PCA (fig 1a.) showed two well defined groups: one corresponding to harvest samples (S0) in the right PC space, and the other including all the stored samples (full lines). The harvest samples had similar properties (lying together) and were sharply differentiated from the others. This indicates that the storage factor had a major influence upon the differentiation of the fruits. Figure 1a also showed differences between samples stored for 3 months (S1) and those stored for 6 months (S2) by PC2 (dotted lines). However, this difference was smaller than that previously observed between harvest and cold storage. Similar results were reported by Soria et al. (1999) and Benavides et al. (2001), who mainly differentiated between fruits on the basis of their storage conditions.

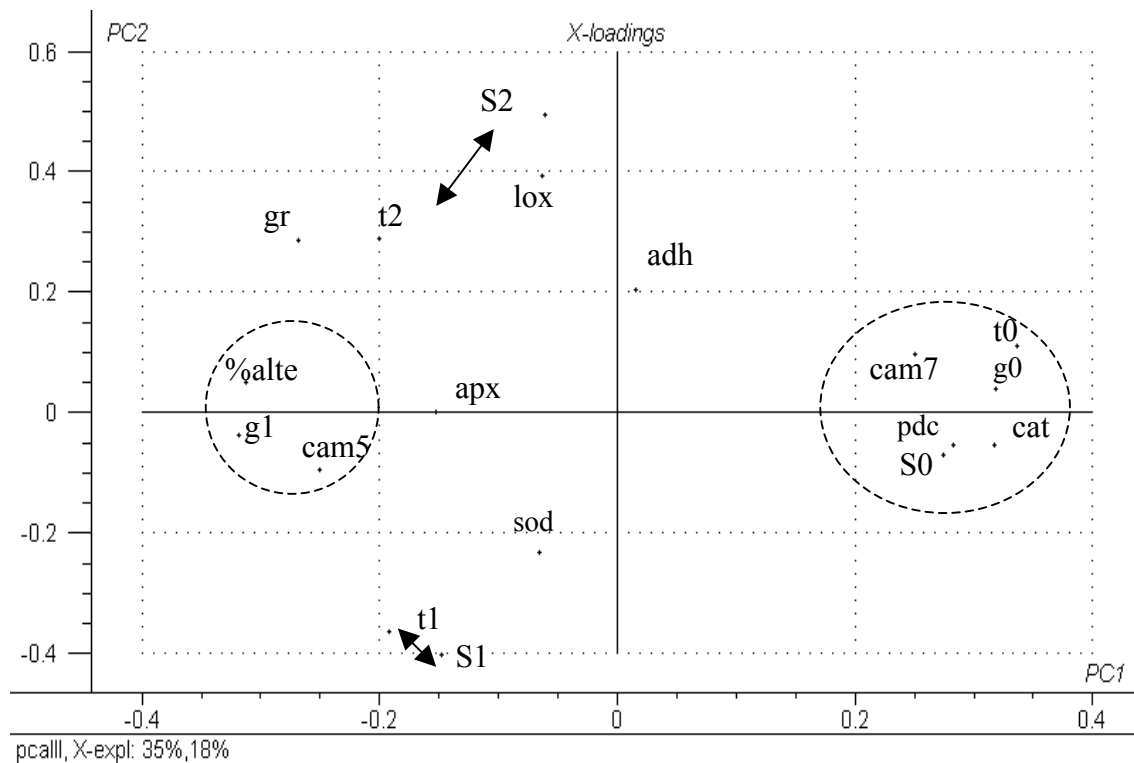
The scores of PC1 vs. PC2 from the same PCA model were plotted in figure 1b and figure 1c using different labels for the samples. Figure 1b showed two groups of samples: a first group labelled g0 (healthy fruits) and placed on the right-hand side of the plot, and a second group on the opposite site (g1) corresponding to the highly\_damaged fruits. Percentages of alteration were organised from right to left in relation to the severity of damage. In figure 1c, PC1 revealed two completely separate groups, with healthy fruits (t0) in one group and damaged fruits (t1 and t2) in the other (full line). The healthy fruits were spread over the whole right region, whereas the damaged fruits were grouped close together on the left hand side. Following PC2, two groups of samples could be clearly defined (dotted lines) on the basis of type of disorder (t1=CB and t2=BH). This result was consistent with the hypothesis that identified BH and CB as two different disorders but it was not conclusive.

Figure 2, shows the loading plot of PC1 vs. PC2. It summarises the main relationship between variables and principal components, and also highlights relationships between different variables themselves (Esbenen, K et al., 1994). Variables that appear close together in this plot correlated positively. This was the case of the group of variables located on the right-hand side and formed by storage condition at 0.7% CO<sub>2</sub> (cam7), CAT activity, PDC activity, harvest time (S0) and healthy fruits (t0) according to PC1. This group correlated negatively with the percentage of damage. At the same time, this percentage positively correlated with storage under high CO<sub>2</sub> concentrations (cam5): a result which has been extensively described in the literature (Herrero, 1986; Richardson and Kupferman, 1997; Larrigaudière et al., 2001b). A clear correlation was found between core browning (t1) and 3 months of storage (S1). In contrast, brown heart (t2) correlated with six months of storage (S2) and LOX activity, but negatively with core browning (opposite loading with respect to PC2). The relationship between the length of storage and the type of disorder was also clear in figures 1b and 1c. Results relating to ADH and APX activity were difficult to interpret because of their position near to the centre of the plot.

The data shown in this first part of our study validate the hypothesis that brown heart and core browning are two different disorders that appear at different time. They confirm results already observed in previous work (results not shown), in which core browning appeared first and brown heart later, but always in different pears. To refine this initial approach, a specific analysis of each disorder was carried out, removing the harvest date and low CO<sub>2</sub> concentration variables (factors which clearly belong to a different group).



**Figure 1.-** Score plot of PC1 vs. PC2 from a full data PCA model. Samples are labelled using the code defined in Materials and Methods. (a) Samples labelled according to length of storage (so, s1, s2); (b) Samples labelled according to intensity of damage, (g0): healthy or slightly damaged fruits, (g1): sharply damaged fruits (>20%); (c) Samples labelled according to type of disorder: core browning (t1) or brown heart (t2). Seventy-two samples are included.



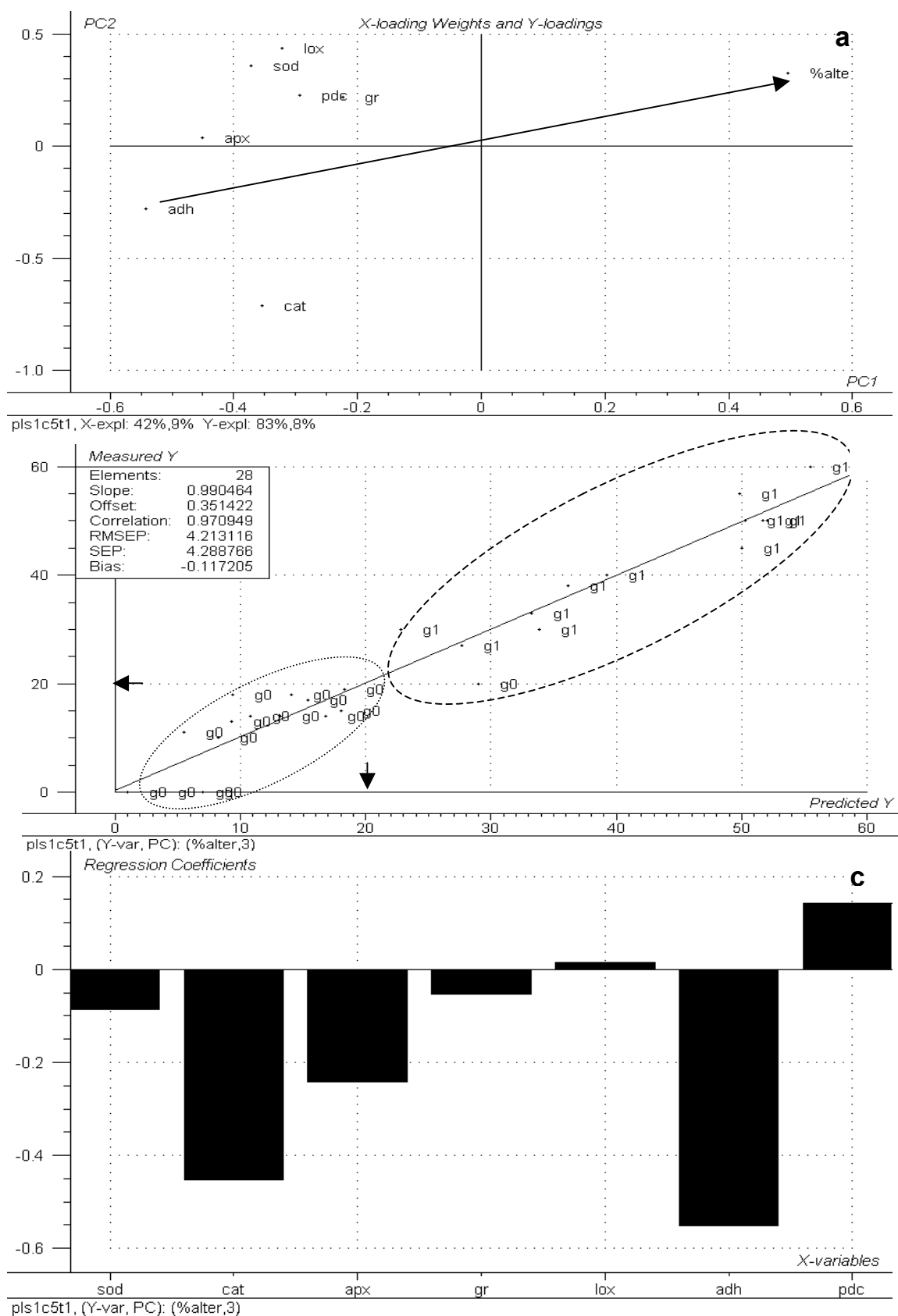
**Figure 2.-** Loading plot of PC1 vs. PC2 from PCA model using all data. Samples are labelled using the code defined in Material and Methods. Eighteen variables are included and labelled using the code defined in the text.

### **PLS model for core browning**

As previously shown, two distinct clusters (groups) could be identified by the type of disorder (Fig. 1c). The first (labelled t1) corresponded to C.B. and the second (labelled t2) corresponded to B.H. To refine this separation, we determined the relationship between the percentage of alteration and enzymatic parameters by separately projecting t1 and t2 samples into their respective PLS.

The model for C.B. is presented in figure 3. The loading plot of PC1 vs. PC2 for core browning explained up to 91% of the total variance of the disorder (figure 3a). In this plot the variable ADH activity correlated very negatively with the percentage of alteration with respect to both PC1 and PC2. CAT activity also correlated negatively with disorder but to a lesser extent than ADH activity. The remaining variables also correlated negatively with the disorder but only with respect to PC1.

Figure 3b shows the predicted percentage of disorder vs. the measured percentage of disorder using full cross-validation. This model revealed two groups: healthy or slightly damaged fruits (g0), and highly damaged samples (g1, % alteration  $\geq 20\%$ ). The validity of this separation was clearly confirmed when we examined the correlation coefficient ( $r=0.97$ ) and RMSEP = 4.21 units of measure. Such a high regression coefficient showed the high correlation between the predicted and measured values of the validation samples. RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) expressed the error expected for future predictions.



**Figure 3.-** PLS model using data corresponding to core browning samples. (a) Loading plot of PC1 vs. PC2 from PLS model of variable percentage of disorder. (b) Predicted vs. measured percentage of disorder using full cross-validation. (c) Regression coefficients between percentage of disorder and all other variables. Thirty-two samples and eight variables are included and labelled using the code defined in Materials and Methods.



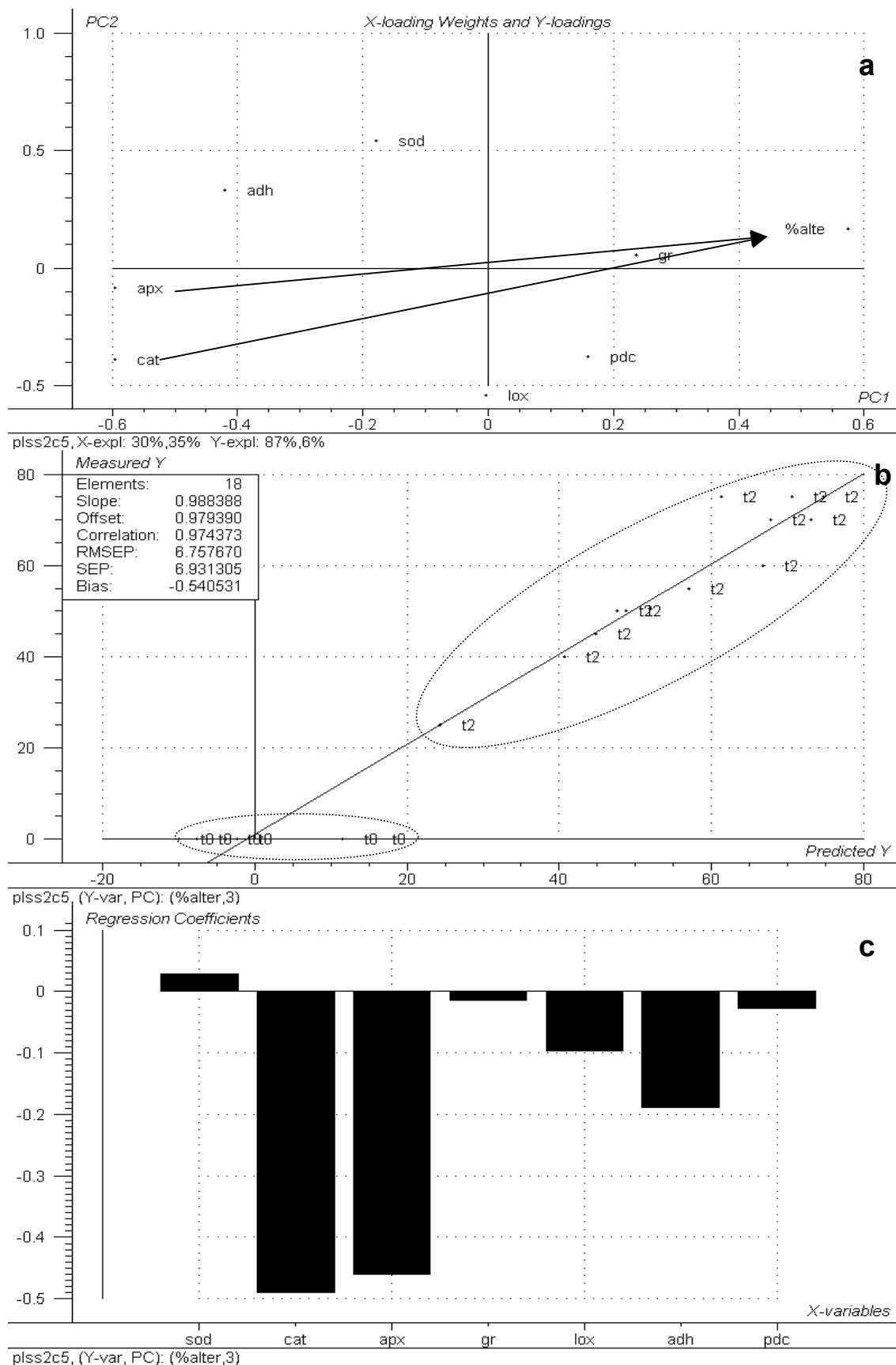
The regression coefficients for each enzymatic parameter are shown in figure 3c. 3 PC's are used, as suggested for full cross validation. This plot quantified the importance of each parameter for predicting the percentage of alteration and summarised the results observed early in the loading plot. The regression coefficients show the increase in the Y-variable (% of alteration) when the corresponding X-variable (enzymatic parameters) was increased by one unit and all the other variables remained constant. Figure 3c shows the importance of ADH and CAT activities in explaining C.B. ADH activity had its highest negative correlation with percentage of damage and seemed to be the most important enzyme involved in the development of C.B. CAT activity had a high negative value too and also seemed to be involved in this disorder. The others enzymes analysed only partially accounted for the incidence of disorder, though APX activity displayed a certain negative correlation. This high negative correlation between ADH activity and core browning indicated that fermentation is probably an underlying metabolism in the incidence of CB. The negative correlation between percentage of disorder and both CAT and APX activity may also indicate a role for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The most important compound that detoxifies H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants is ascorbate (Melhorn et al., 1996). This compound correlated negatively ( $r=-0.5$ ) with the disorder (results not shown). This led us to believe that an oxidative process could also be involved in this disorder, but to a lesser extent than fermentation.

### ***PLS model for brown-heart***

The model for B.H. is presented in Figure 4. The loading plot for the percentage of brown-heart obtained using the first two PLS factors explained up to 93% of the validation variance. This undeniably high value was mainly due to APX and CAT activity, which correlated strongly between them and revealed high loading values with respect to PC1 and PC2 respectively. These two variables most closely anti-correlated with the percentage of disorder in both directions (PC1 and PC2). In the case of B.H, ADH presented a weaker negative correlation with damage. The remaining variables can be considered as unimportant for prediction (lowest loading values in direction PC1).

The correlation between predicted and measured values was very high ( $r=0.97$ ) and the value for RMSEP (6.7) was also very good (Figure 4b) and led to a highly effective model for predicting the incidence of disorder in new samples.

The plot for the regression coefficient (figure 4c) showed that CAT and APX activity presented the highest negative values. This result indicated their importance in the incidence of B.H. In contrast to C.B, ADH activity did not appear to be very relevant. In another experiment, we noted that ascorbate presented a very negative correlation ( $r=-0.9$ ) with B.H. disorder (result not shown). It is generally recognised that a fall in ascorbate may lead to greater susceptibility to peroxidation, followed by decompartmentation and finally browning (Chervin et al., 1996; and Lentheric et al., 1999). Supporting this hypothesis, our model showed that oxidative processes were some of the most important causes of B.H. This result confirmed the findings of other earlier works (Pintó et al., 2001) and indicated that B.H. may involve a very different metabolic pathway than that responsible for C.B.



**Figura 4.-** PLS model using data corresponding to brown heart samples. (a) Loading plot of PC1 vs. PC2 from PLS model of variable percentage of disorder. (b) Predicted vs. measured percentage of disorder using full cross-validation. (c) Regression coefficients between percentage of disorder and all other variables. Eighteen samples and eight variables are included and labelled using the code defined in Materials and Methods.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the INIA (SC97-043) and from the European Union (FAIR programme CT96-1803).

## REFERENCES

- Aono, M., Saji, H., Fujiyama, K., Sugita, M., Kondo, N., and Tanaka, K., 1995. Decrease in activity in glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 107, 645-648.
- Artés, F., 1995. Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la postrecolección. III. Tratamientos gaseosos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 35, 247-269.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., and Come, D., 1996. Changes in malonaldehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. *Physiol. Plantarum* 97, 104-109.
- Benavides, A., Recasens, I., Casero, T., and Puy, J., 2001. Chemometric analysis of Golden Smothee apples treated with two preharvest calcium spray strategies in the growing season. *J. Sci. Food Agric.* 81, 943-952.
- Bertolini, P., Bottardi, S., Dalla, Rosa M., and Folchi, A., 1987. Effect of controlled atmosphere storage on the physiological disorders and quality of Conference pears. *Italian J. Food Sci.* 4, 303-312.
- Biemelt, S., Keetman, U., and Albrecht, G., 1998. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.* 166, 651-658.
- Borracino, G. L., Mastropasqua, S., De Leonardis, S., and Dipierro, S., 1994. The role of ascorbic acid system in delaying the senescence of oat (*Avena sativa* L.) leaf segments. *J. of Plant Physiol.* 144, 161-166.
- Camo, AS., 1996. The Unscrambler (Version 6.11). Camo AS, Trondheim .
- Chervin, C., Brady, C., Patterson, B., and Faragher, J., 1996. Could studies on cell responses to low oxygen levels provide improved options for fruit storage and desinfestation? *Postharvest Biol. Technol.* 7, 289-299.
- Clairbone, A., 1985. Catalase activity. In: *Handbook of methods for oxygen radical research.* (Greenwald, R., Ed.) CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 283-284.
- De la Plaza, J.L., 1986. La vida post-recolección de los frutos. *Fruticultura profesional* 2, 28-35.
- Eccher Zerbini, P., Rizzolo, A., Brambilla, A., Cambiaghi, P., and Grassi, M., 2002 Loss of ascorbic acid during storage of Conference pears in relation to the appearance of brown heart. *J Sci. Food Agric.* 82, 1007-1013.

- Esbensen, K., Midtgaard, T., and Schönkopf, S., 1994. *Multivariate analysis in practice*. Camo, A.S. Ed, Trondheim, Norway.
- Foyer, C., and Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25 .
- Giannopolitis, C., and Ries, N., 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J., 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Herrero, A., 1986. Corazón pardo en pera. Alteraciones en post-recolección. *Fructicultura professional*, pp: 6.
- Ke, D., Yahia, E., Mateos, M., and Kader, A., 1994. Ethanolic fermentation of "Barlett" pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119, 976-982.
- Larrigaudière, C., Lentheric, I., Pintó, E. and Vendrell, M., 2001a. Short-term effects of air and controlled atmosphere storage on antioxidant metabolism in Conference pears. *J. Plant Physiol.* 158, 1015-1022.
- Larrigaudière, C., Pintó, E., Lentheric, I., and Vendrell, M., 2001b. Involvement of oxidative processes in the development of core browning in controlled-atmosphere stored pears. *J. Hort. Sci. and Biotechnol.* 76, 157-162.
- Lentheric, I., Pinto, E., Vendrell, M., and Larrigaudière, C., 1999. Harvest date affects the antioxidative systems in pear fruits. *J. Hort. Sci. and Biotechnol.* 74, 791-795.
- Luton, M., and Holland, A., 1986. The effects of preharvest factors on quality of stored "Conference" pears. I. Effects of orchard factors. *J. Hort. Sci.* 61, 23-32.
- Melhorn, H., Lelandais, M., Korth, H., and Foyer, C., 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett* 378, 203-206 .
- Nakano, Y., and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Noctor, G., and Foyer, C., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Pesis, E., Levi, A., and Ben Aire, R., 1988. Role of acetaldehyde in the removal of astringency from persimmon fruits under various modified atmospheres. *J Food Sci.* 53, 153-156.
- Pintó, E., Lentheric, I., Vendrell, M., and Larrigaudière, C., 2001. Role of fermentative and antioxidant metabolism in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears. *J Sci. Food Agric.* 81, 364-370.
- Prasad, T., Anderson, M., and Steward, C., 1994. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* 105, 619-625.

- Richardson, D. and Kupferman, E., 1997. Controlled atmosphere storage of pears. Proceeding 7<sup>th</sup> Int. Controlled Atmosphere Research Conference, Davis, California, 138-144.
- Roelofs, F., and De Jager, A., 1997. Reduction of brownheart in Conference pears. Proc 7<sup>th</sup> Int. Controlled Atmosphere Research Conf, Davis, CA pp 138-144.
- Soria, Y., Recasens, I., Gatus, F., and Puy, J., 1999. Multivariate Analysis of superficial scald susceptibility on Granny Smith apples dipped with different postharvest treatments. J. of Agric. and Food Chem. 47, 4854-4858.
- Surrey, K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxygenase activity. Plant Physiol. 39, 65-69.
- Veltman, RH., Larrigaudière, C., Wichers, HJ., Van Schaik, ACR., Van der Ples, LHW., 1999a. Polyphenol oxidase activity and polyphenol content are not limiting factors during brown core development in pears. J. of Plant Physiol. 154, 697-702.
- Veltman, RH., Sanders, MG., Persijn, ST., Peppelenbos, HW., and Oosterhaven, J., 1999b. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears. Physiol. Plantarum 107, 39-45.



# Capítol 4

---

## **Relationship between quality parameters and internal disorders in pear by means of multivariate analysis**

E. PINTÓ<sup>1</sup>, I. LENTHERIC<sup>1</sup>, J. PUY<sup>2</sup>, C. LARRIGAUDIÈRE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UdL-IRTA, CeRTA, Postharvest Unit, Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain

<sup>2</sup> University of Lleida, Department of Chemistry, Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain

Enviat a:

**Postharvest Biology and Technology**