

# ***Capítol 6***

---

**Caracterització dels fruits sans i dels fruits alterats mitjançant  
l'anàlisi de classificació**

## **CARACTERITZACIÓ DELS FRUITS SANS I DELS FRUITS ALTERATS MITJANÇANT L'ANÀLISI DE CLASSIFICACIÓ**

### **1.- INTRODUCCIÓ**

Aquest capítol de la investigació vol donar resposta a un dels objectius plantejats, el qual pretén distingir entre fruits sans i fruits alterats. El poder identificar els fruits alterats, i a ser possible mitjançant un paràmetre fàcil de mesurar o determinar, és una de les finalitats últimes que busquen les cooperatives. Per això, s'ha estudiat la diferenciació entre aquests dos tipus de fruits a partir de diversos paràmetres, com són:

- Paràmetres qualitius, tant destructius com no destructius.
- Paràmetres enzimàtics relacionats amb el metabolisme antioxidant i el metabolisme fermentatiu.
- Precursors o marcadors de diferents metabolismes com l'antioxidatiu, el fermentatiu i el metabolisme implicat en la biosíntesi de l'etilè.

A més, també es pretén veure quin o quins dels metabolismes analitzats, és el més implicat en la caracterització dels fruits que presenten aquestes alteracions fisiològiques. Aquesta diferenciació entre fruits sans i alterats s'ha dut a terme de forma separada per als fruits afectats de llocat i per als afectats de cor marró, ja que dels resultats obtinguts se'n pot extreure que es tracta de dues fisiopaties diferents.

El mètode d'anàlisi emprat ha estat la classificació. El principal objectiu d'aquesta anàlisi és assignar noves mostres a cadascuna de les classes o grups existents, que com sabem en el nostre estudi, són la de fruits alterats (%alteració  $\geq 20\%$ ) i la de fruits sans.

Aquest estudi de classificació complementa els tres articles d'anàlisi multivariant presentats anteriorment i per tant, les mostres i variables emprades en aquest apartat han estat les mateixes que s'han citat en els articles.

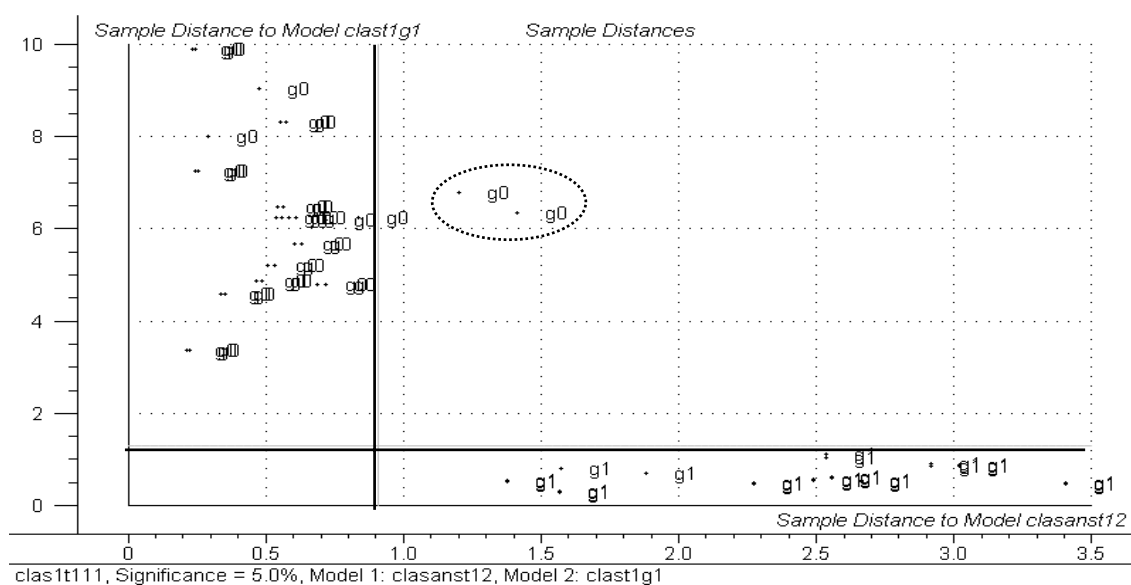
### **2.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ EN FUNCIÓ DELS ENZIMS IMPLICATS EN EL METABOLISME ANTIOXIDATIU I FERMENTATIU**

La classificació s'utilitza per conèixer si els paràmetres enzimàtics són susceptibles de determinar si un fruit estarà afectat per una d'aquestes dues alteracions. També s'utilitzarà com a eina de diagnòstic per identificar quines són les variables més importants per a definir cada model (*Modelling power*), així com per a identificar la variable o variables que ens permetran diferenciar entre ambdós models o classes (*Discrimination power*).

Abans de començar la classificació pròpiament dita, cada classe (fruits sans, g0, i fruits alterats, g1), ha estat descrita per un model PCA. Aquest model PCA per a cada classe ha estat construït a partir de mostres amb valors d'alteració coneguts i dels paràmetres enzimàtics com a variables-X. Tots els models han estat validats amb *full cross validation*.

## 2.1.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ PER AL LLOCAT

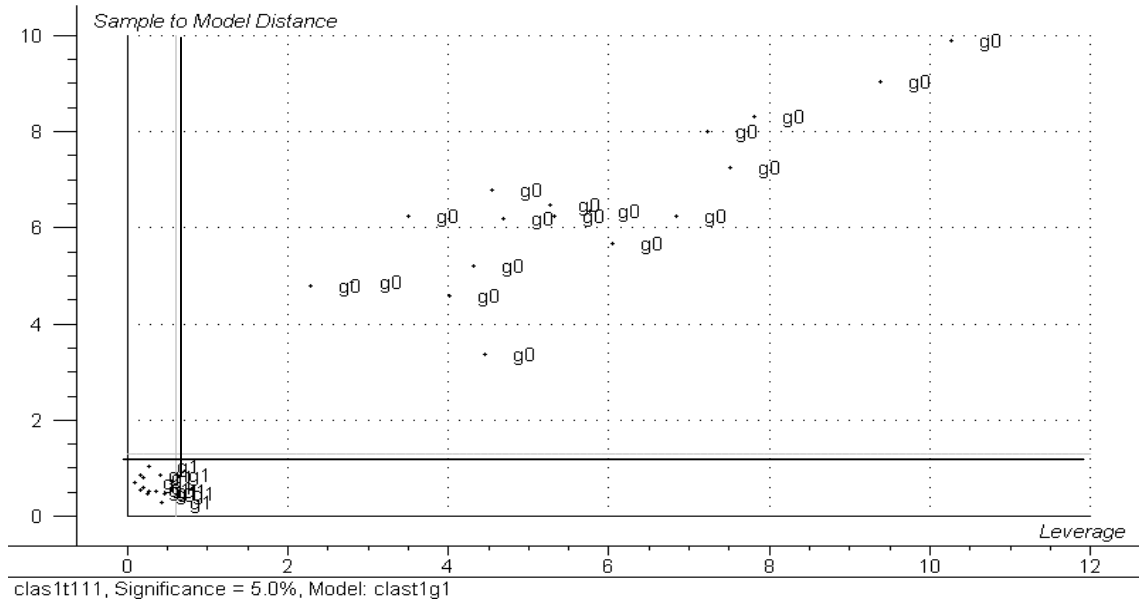
Els dos models han estat construïts amb dos PC's. El primer pas és mesurar com són de diferents els dos models i això, es dur a terme mitjançant el gràfic *Model distance*. Distàncies més grans que 3 indiquen que els dos models són significativament diferents. En el nostre estudi, aquesta distància és propera a 100 unitats (resultat no mostrat), el que mostra l'alta validesa del model. El segon esglaió és interpretar els resultats de la classificació mitjançant el gràfic de *Cooman's* o mitjançant el gràfic  $S_i$  vs.  $H_i$ . La figura 1 mostra el gràfic de *Cooman's* per les dues classes a un nivell de significació del 5%.



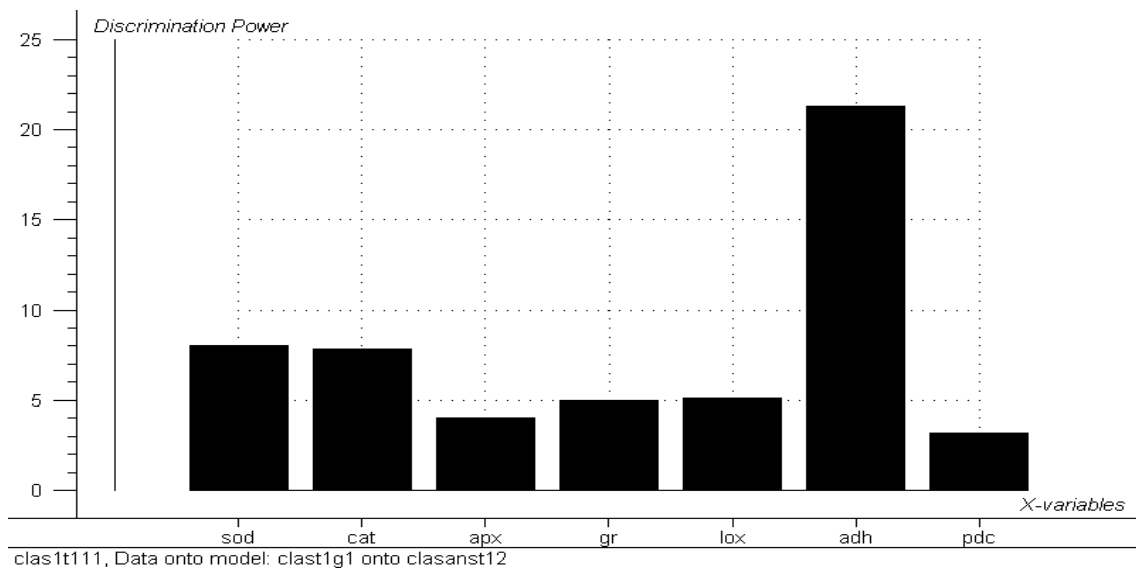
**Figura 1.-** Model de classificació per les mostres de llocat . Gràfic de *Cooman's* per les dues classes. 30 mostres i set variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en un cercle en línies discontinues.

Segons aquest gràfic tant els fruits sans com els alterats estan ben classificats (a l'esquerra i a la part inferior de la figura respectivament), excepte dos fruits sans (línies discontinues), que no es poden classificar. Malgrat que aquesta primera classificació és realment acurada, la complementarem amb el gràfic  $S_i$  vs.  $H_i$  per als fruits danyats, el qual és molt més precís que l'anterior ja que la classificació es dur a terme en funció de  $S_i$  (distància al model) i  $H_i$  (leverage). En aquest gràfic, totes les mostres estan correctament classificades a un nivell de significació del 5% (Figura 2). Els fruits danyats han d'estar i estan al quadrant inferior esquerra mentre que els fruits sans han d'estar fora d'aquests límits. A més, aquests darrers estan fora dels límits marcats pels dos paràmetres ( $S_i$  i  $H_i$ ), és a dir, segons tots dos paràmetres es tracta de fruits que no són alterats.

A la Figura 3, es mostra el poder de discriminació que té cada variable per discriminar entre ambdues classes (fruits sans i fruits alterats). Variables amb un poder de discriminació superior a 3, són considerades com a variables importants per a diferenciar entre les dues classes. En el nostre cas, la variable més important és l'activitat de l'alcohol deshidrogenasa (ADH) però, no podem oblidar que la resta també són importants. Aquest últim resultat confirma els resultats obtinguts anteriorment amb el model PLS per al llocat, en el qual totes les variables semblen tenir importància per a definir la fisiopatia.



**Figura 2.** Model de classificació per les mostres de llocat . Gràfic  $S_i$  vs.  $H_i$  per als fruits danyats. 30 mostres i set variables han estat estudiades.



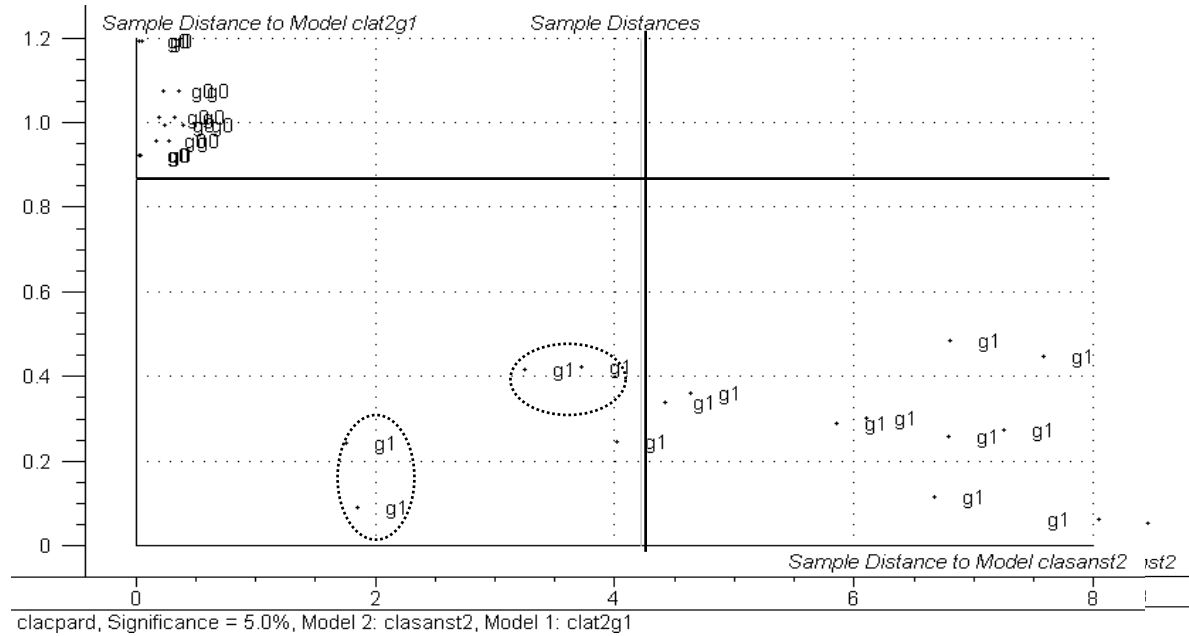
**Figura 3.- Poder de discriminació** de cada variable per a discriminar entre els fruits sans i els fruits alterats per llocat.

## 2.2.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ PER AL COR MARRÓ

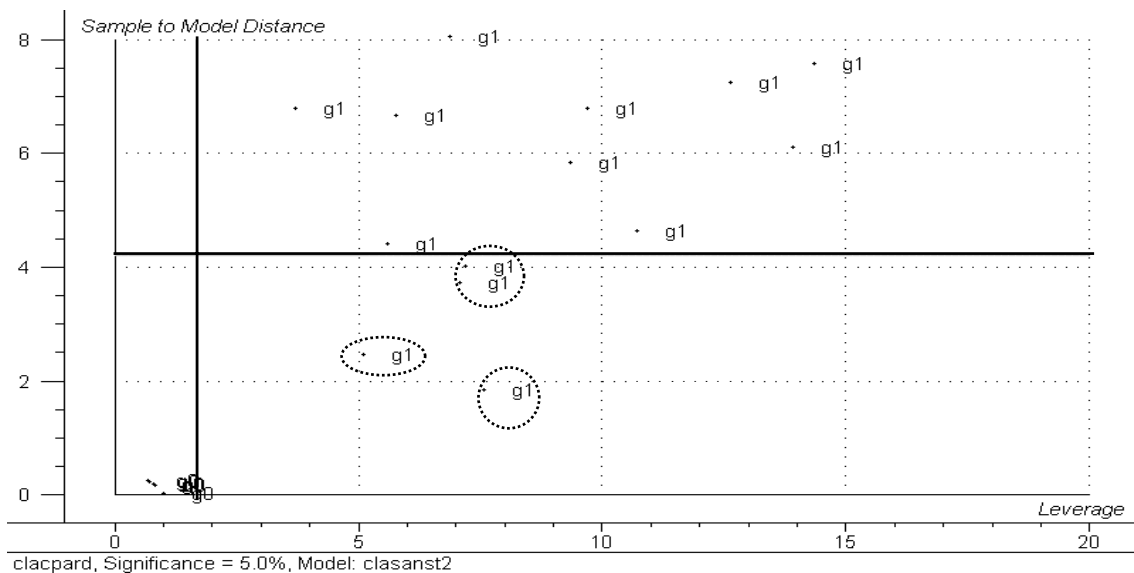
Per al cor marró, el programa suggereix quatre PC's com a número òptim de PC's per als fruits alterats. El model de fruits sans és el mateix que s'ha utilitzat en el cas del llocat. El gràfic *Model distance* presenta un valor proper a 150 unitats (resultat no presentat), el qual

representa una molt bona separació entre ambdues classes i per tant, els fruits sans i els fruits alterats semblen ser realment diferents.

Si ens fixem en el gràfic de Cooman's (Figura 4), totes les mostres han estat correctament classificades a un nivell de significació del 5%, excepte quatre fruits danyats els quals pertanyerien als dos models (línies discontinúes).



**Figura 4.-** Model de classificació per les mostres de cor marró . Gràfic de *Cooman's* per les dues classes. 30 mostres i set variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en cercles de línies discontinúes.

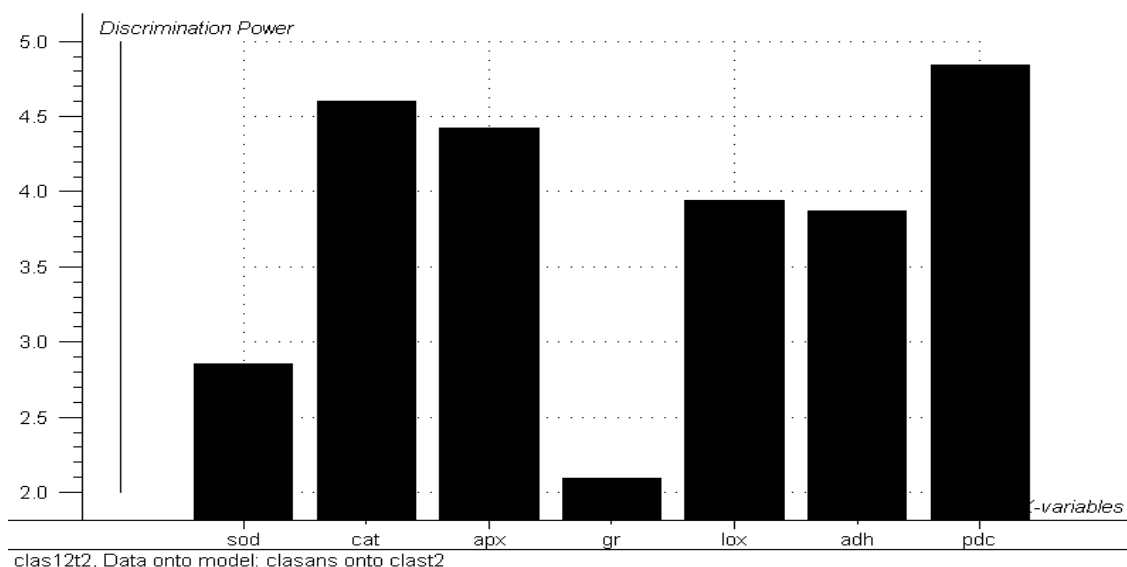


**Figura 5.-** Model de classificació per les mostres de llocat . Gràfic de  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits sans. 30 mostres i set variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en cercles de línies discontinúes.

En el gràfic  $S_i$  vs.  $H_i$  per als fruits sans (Figura 5), tots els fruits sans estan ben classificats (quadrant inferior esquerra) i solament quatre fruits alterats no acabarien d'estar fora d'aquests límits. Segons la distància al model ( $S_i$ ) pertanyerien als fruits sans però segons el leverage ( $H_i$ ) es tractaria de fruits alterats. Per tant, en funció d'aquest últim paràmetre tots els fruits estarien correctament classificats a un nivell de significació del 5%.

El poder de discriminació (Figura 6) mostra que les activitats de la catalasa (CAT) i de l'ascorbat peroxidasa (APX) són importants per a diferenciar entre fruits sans i alterats. Els enzims involucrats en el metabolisme fermentatiu també apareixen com a factors rellevants però, la seva importància és molt inferior a la que presentava l'ADH en el llocat (poder de discriminació superior a 20).

Aquests resultats semblen indicar que el llocat és una alteració força relacionada amb el metabolisme fermentatiu i també, de forma menys important amb el metabolisme oxidatiu. En canvi, el cor marró està més relacionat amb el metabolisme antioxidant. Cal destacar també, que aquests paràmetres enzimàtics han permès distingir entre fruits alterats i fruits sans, objectiu que persegueix tota central fructícola. Ara bé, el problema està en què les determinacions enzimàtiques són massa costoses de realitzar i per tant, s'hauria de buscar algun altre paràmetre que fos més fàcil de quantificar i que alhora es pugues utilitzar com a marcador.



**Figura 6.- Poder de discriminació de les variables per tal de discriminar entre fruits sans i fruits alterats per cor marró.**

### 3.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ EN FUNCIÓ DELS PARÀMETRES DE QUALITAT

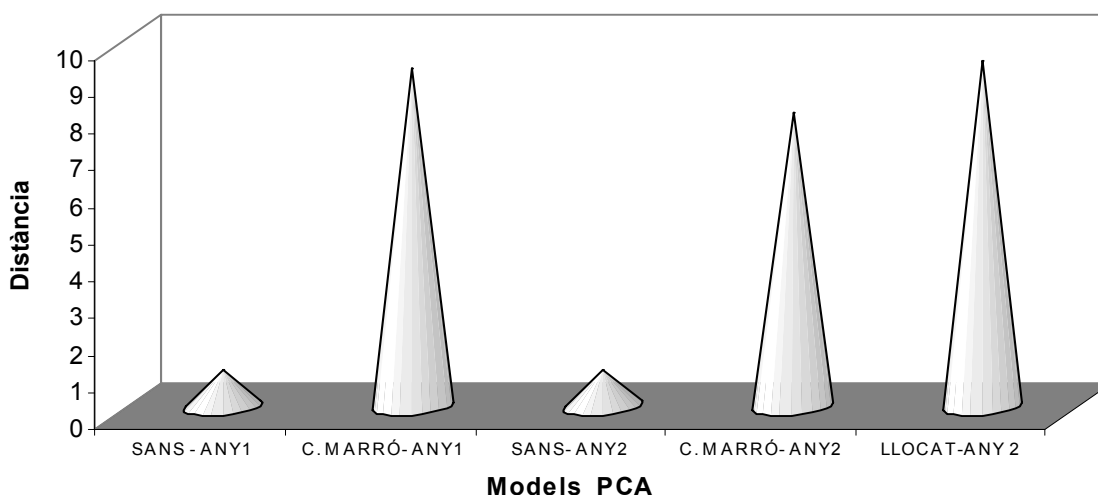
#### 3.1.- CLASSIFICACIÓ PER AL COR MARRÓ

L'anàlisi d'aquesta alteració mitjançant paràmetres de qualitat es va dur a terme durant dues campanyes consecutives. En la primera es van estudiar els paràmetres colorimètrics,  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ , i els paràmetres de qualitat, SSC, acidesa i fermesa com a variables-X i com a variable-

Y, el percentatge d'alteració. Aquesta variable va ser expressada en funció d'uns índexs, que representaven: I0 = fruits sans, I1 = danys molt lleugers (taques discretes en el cor), I2 = danys lleugers (cor marró sense cavitats en la polpa), I3 = danys moderats (cor marró + cavitats de poca grandària en la polpa), I4 = danys severos (cor marró + grans cavitats en la polpa) i I5 = danys molt severos (cor i polpa completament danyats). En canvi, en la segona campanya solament es van estudiar els SSC, la fermesa i l'acidesa.

### 3.1.1.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ PER AL COR MARRÓ EN FUNCIÓ DELS PARÀMETRES COLORIMÈTRICS I DELS PARÀMETRES DE QUALITAT (1r any)

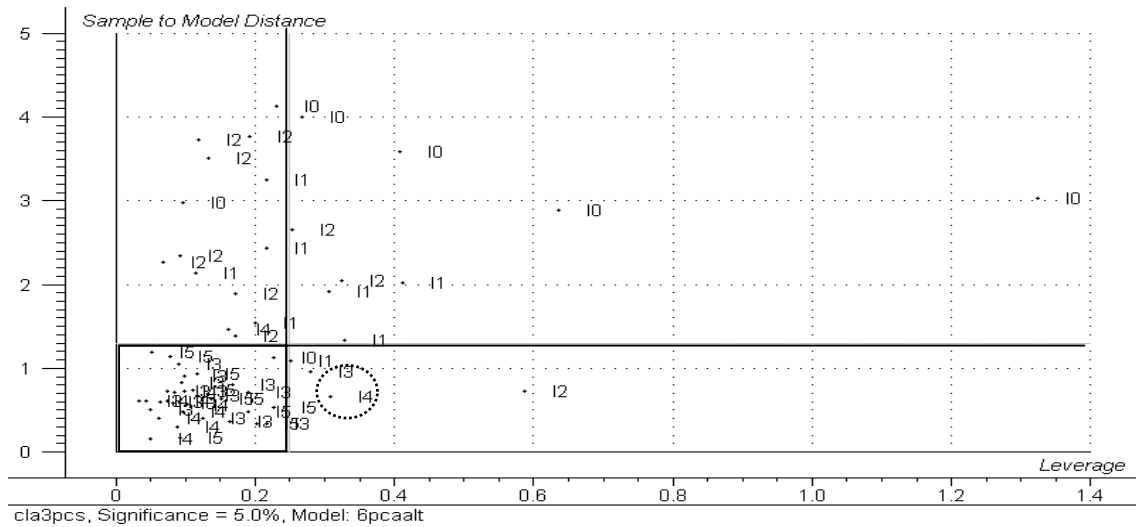
Les dues classes existents eren: baix nivell de l'alteració, <20%, (I0, I1 i I2) i alt nivell de l'alteració,  $\geq 20\%$ , (I3, I4 i I5). Per cadascuna d'aquestes classes es va construir un model PCA amb 3 PC's i validat amb *full cross validation*. Aquests dos models presentaven una distància entre ells propera a 9 unitats (Figura 7), la qual indica que aquests són significativament diferents entre si i per tant, a priori, que la classificació és possible.



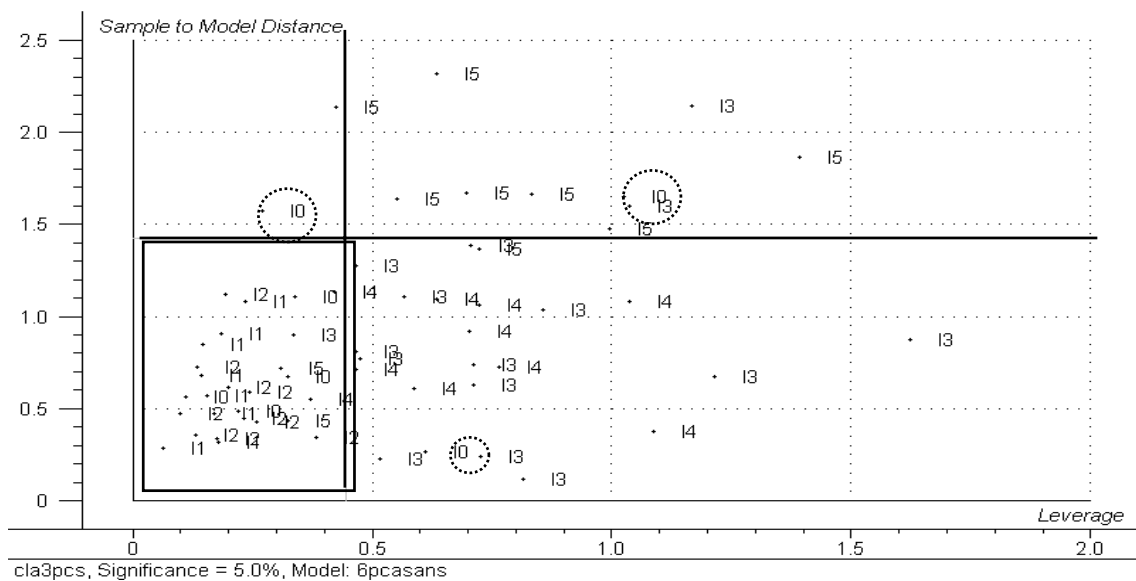
**Figura 7.-** Model de classificació corresponen a les campanyes 98/99 i 99/00. **Gràfic de distància entre classes.**

Els resultats de la classificació són presentats en els gràfics  $S_i$  vs  $H_i$  per cada model. En la figura 8 es mostra el gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  construït amb 2 PC's per als fruits danyats, el qual indica que tots els fruits danyats excepte dos d'ells estan ben classificats (dins del quadre) a un nivell de significació del 5%. Malgrat tot, una bona part dels fruits sans, segons el leverage, pertanyen a les dues classes i solament un d'ells estaria mal classificat.

En la figura 9 es mostra el gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  construït amb 3 PC's per als fruits sans, el qual indica que tots els fruits sans estan ben classificats (dins del quadre), excepte dos d'ells que els classifica com a alterats i dos més que pertanyerien als dos models. També es pot observar que els dos fruits alterats, mal classificats en el model anterior, apareixen en aquest gràfic dins del quadre dels fruits sans.



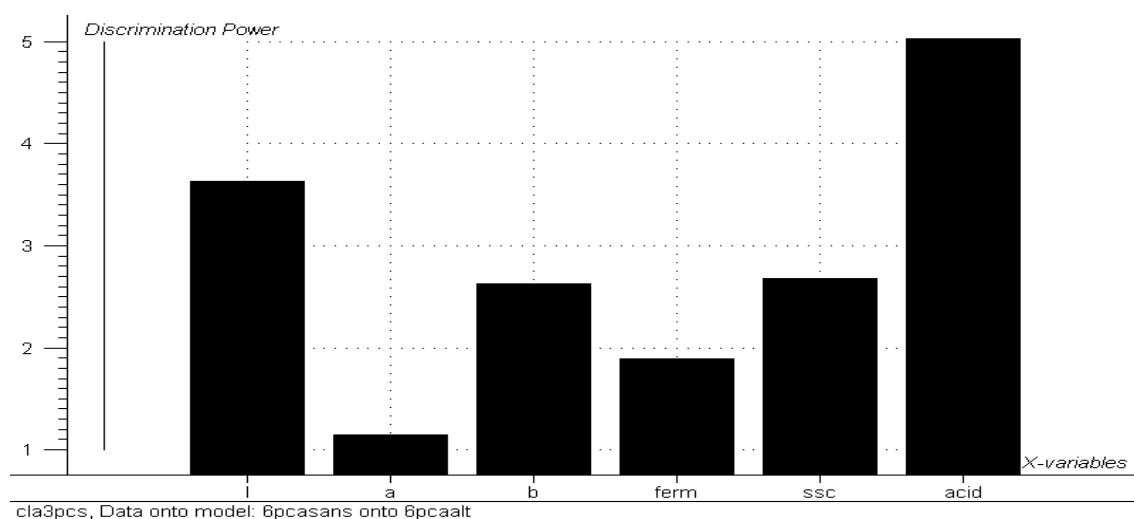
**Figura 8.-** Model de classificació per les mostres de cor marró de la campanya 98/99. Gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits danyats. 60 mostres i sis variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en cercles en línies discontinües.



**Figura 9.-** Model de classificació per les mostres de cor marró de la campanya 99/00. Gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits sans. 60 mostres i sis variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en cercles en línies discontinües.

El següent pas es veure quina o quines variables són més importants per a diferenciar entre ambdues classes. De la figura 10, se'n desprèn que és l'acidesa l'única variable important per a poder distingir les mostres (poder de discriminació > 3). Ara bé, el què no sabem és com quantificar aquesta importància. En els resultats de l'anàlisi PLS també es posa de manifest la importància d'aquesta variable, la qual està correlacionada negativament amb el percentatge d'alteració. En aquest mateix gràfic també s'observa la poca o nul·la importància de les variables colorimètriques, fet pel qual no seran incloses en estudis posteriors.





**Figura 10.- Gràfic del poder de discriminació** de les variables per tal de discriminar entre els fruits sans i els alterats per cor marró.

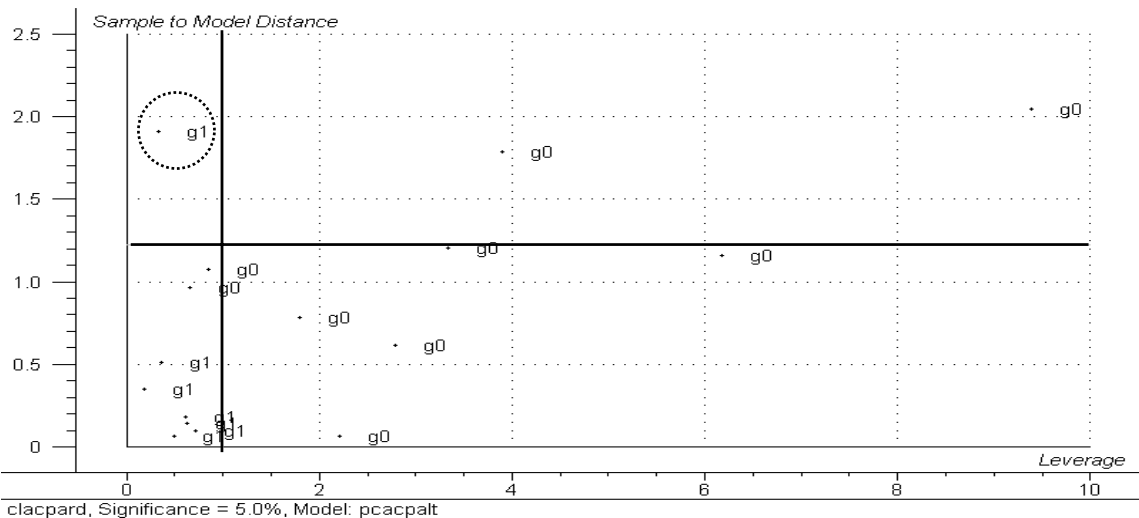
### 3.1.2.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ PER AL COR MARRÓ EN FUNCIÓ DELS PARÀMETRES DE QUALITAT (2n any)

En aquesta part de l'estudi, es pretén determinar si els fruits són sans ( $g_0 < 20\%$ ) o alterats ( $g_1 \geq 20\%$ ), en funció de tres paràmetres força fàcils de determinar com són: l'acidesa, la fermesa i els SSC.

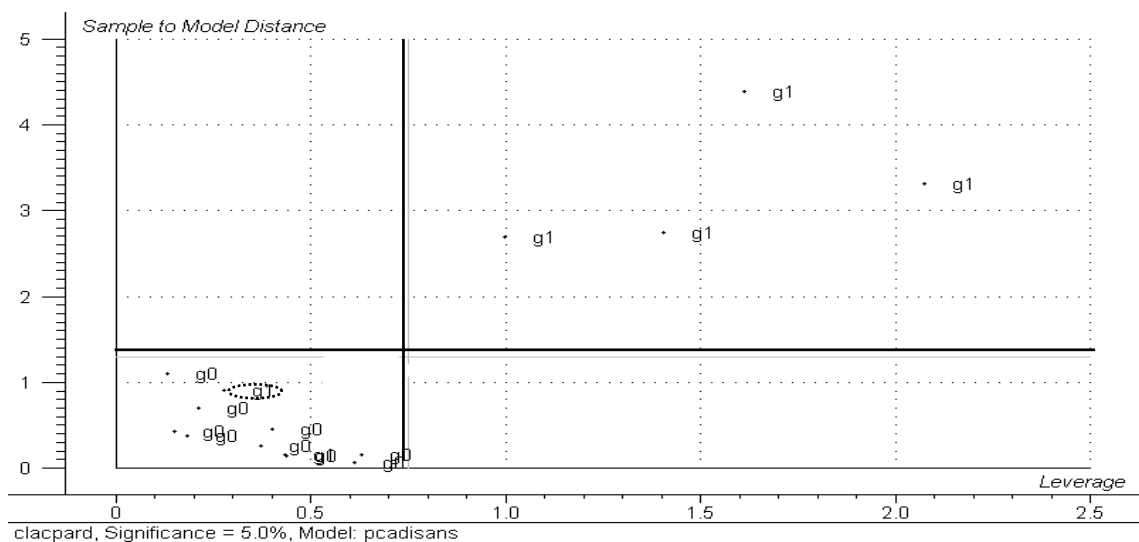
Els models, construïts amb un PC, són significativament diferents (distància propera a 7 unitats, figura 7) i per tant, en principi, les mostres podran ser classificades. Els resultats de la classificació es presenten en els gràfics  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits danyats (Figura 11) i per als fruits sans (Figura 12). La figura 11 mostra que per un PC, tots els fruits danyats, excepte un d'ells, estan correctament classificats a un nivell de significació del 5%. Alguns fruits sans, en funció de la distància al model ( $S_i$ ) pertanyen a les dues classes i dos d'ells estan classificats com a fruits alterats; per aquesta raó s'estudia també el gràfic per als fruits sans. El límit de  $S_i$  depèn del nivell de significació i el límit del leverage ( $H_i$ ) depèn del nombre de PC's utilitzats. Així si augmentéssim el nivell de significació fins a un 10%, aquestes dues mostres sanes ja no serien classificades com a alterades. En el gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits sans (Figura 12), s'observa que tots els fruits sans estan correctament classificats amb un PC per un nivell de significació del 5%. Però, un fruit danyat continua essent classificat com a sa.

En la figura 13, es mostren els gràfics del poder de modelatge construïts amb un PC per cadascuna de les classes. Aquest indica quina part de la variància és utilitzada per cada variable per descriure el model. Les variables amb un poder de modelatge superior a 0,3 són les que tenen una gran influència en el model.

En tots dos casos, s'observa que la variable que més defineix cada classe és l'acidesa. Ara bé, a partir d'aquesta informació solament sabem que aquest paràmetre és el més important per caracteritzar tant els fruits alterats com els sans, però desconeixem quin tipus de relació existeix amb la variable estudiada. No oblidem que els SSC i la fermesa també són variables importants (valors  $>0,3$ ).

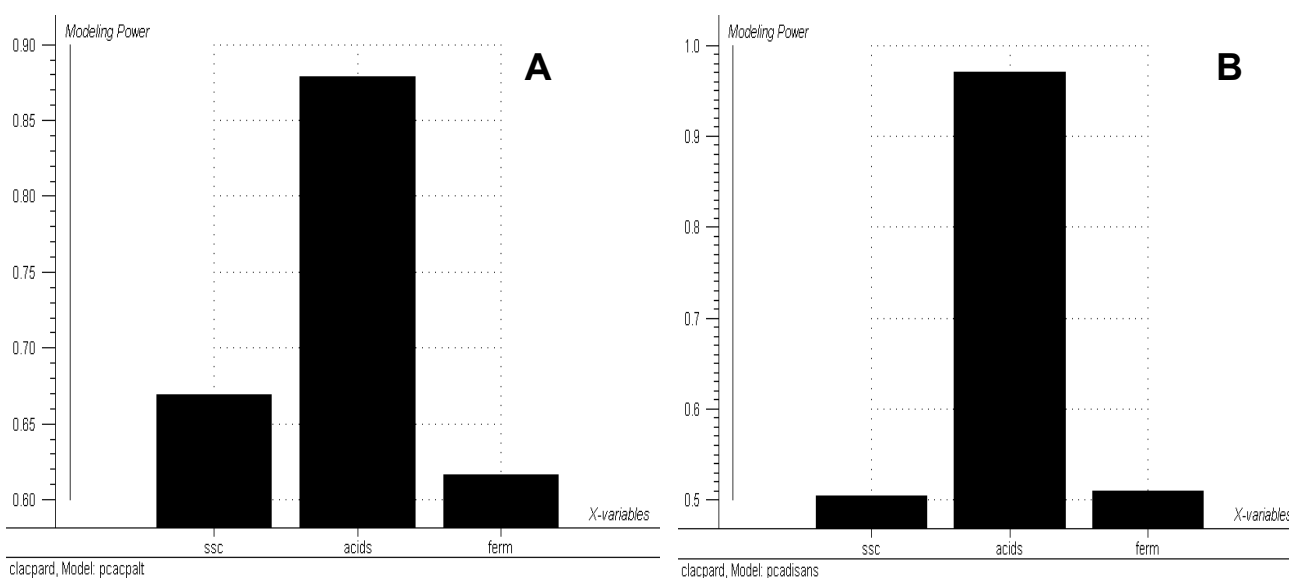


**Figura 11.-** Model de classificació per les mostres de cor marró de la campanya 98/99. Gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits danyats. 18 mostres i 3 variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en un cercle en línies discontinües.



**Figura 12.-** Model de classificació per les mostres de cor marró de la campanya 98/99. Gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits sans. 18 mostres i 3 variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en un cercle en línies discontinües.

Anteriorment en l'estudi PLS, també s'ha vist que l'acidesa era la variable que més es correlacionava amb el desordre. Més concretament, a major incidència del desordre, menor era el contingut en àcids. A priori, es podria pensar que aquesta disminució de l'acidesa és una conseqüència del procés de maduració, però no sembla ser aquest el cas, ja que aquests fruits mantenen els seus atributs de qualitat. Alguns autors (Larrigaudière *et al.*, 1998, Eccher Zerbini *et al.*, 2002 i Veltman *et al.*, 1998 i 1999 ) han associat el cor marró a la desaparició de l'àcid ascòrbic (AA) i han trobat que els fruits amb un alt contingut d'aquest àcid solament manifestaven lleugerament el cor marró. Segons Eccher Zerbini *et al.* 2002, el cor marró apareix quan el contingut d'AA en el fruit és d'un 5% del valor inicial que presentava a la collita. Per Veltman *et al.* 1999, l'àcid ascòrbic podria ser utilitzat com a indicador del cor marró, però per aquest autor el cor marró es dona per continguts d'AA bastant superiors als d'Eccher Zerbini.



**Figura 13 .-** Model de classificació per les mostres de cor marró de la campanya 98/99. (A) Gràfic del poder de modelatge per als fruits alterats. (B) Gràfic del poder de modelatge per als fruits sans. 18 mostres i 3 variables han estat estudiades.

### 3.1.3.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ PER AL LLOCAT EN FUNCIÓ DELS PARÀMETRES DE QUALITAT

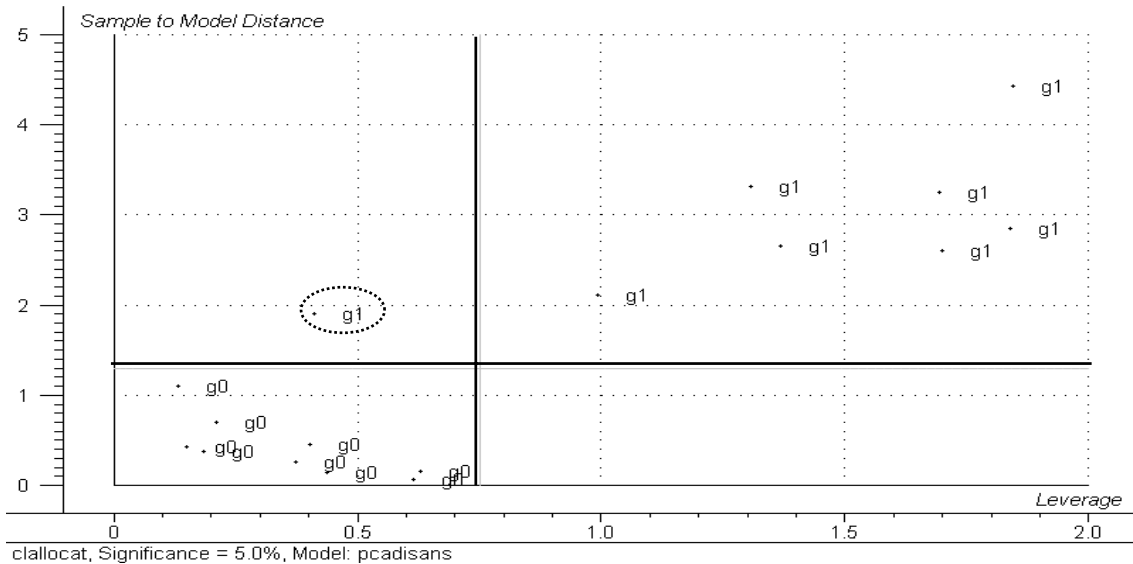
A l'igual que per al cor marró, es pretén determinar en funció dels SSC, la fermesa i l'acidesa si els fruits són sans, o bé alterats per llocat. Els dos models PCA construïts amb un PC, segons suggeria el model, són significativament diferents (distància propera a 8 unitats, figura 7) i per tant, a priori, la classificació és possible. Ara bé, la distància entre el model PCA per al cor marró i el model PCA per al llocat és propera a la unitat i per tant, aquests dos models no són significativament diferents. És a dir, sembla que es pugui diferenciar entre fruit sa i alterat però no pas entre alterat per cor marró i alterat per llocat.

Si s'estudia el gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits sans (Figura 14), es pot observar que tots els fruits sans estan correctament classificats a un nivell de significació del 5% i solament un fruit alterat, pertany als dos models segons el *leverage*. En el gràfic del poder de discriminació (figura 15A), s'observa que les variables més importants per a diferenciar entre ambdues classes són els SSC seguits de la fermesa, mentre que l'acidesa sembla que no és important. El gràfic del poder de modelatge per als fruits alterats (figura 15B), indica que la fermesa i l'acidesa són les variables més importants per a caracteritzar-los, seguides dels SSC. Recordem, que la variable més important també per a caracteritzar els fruits sans en el cas del cor marró era l'acidesa (figura 13B).

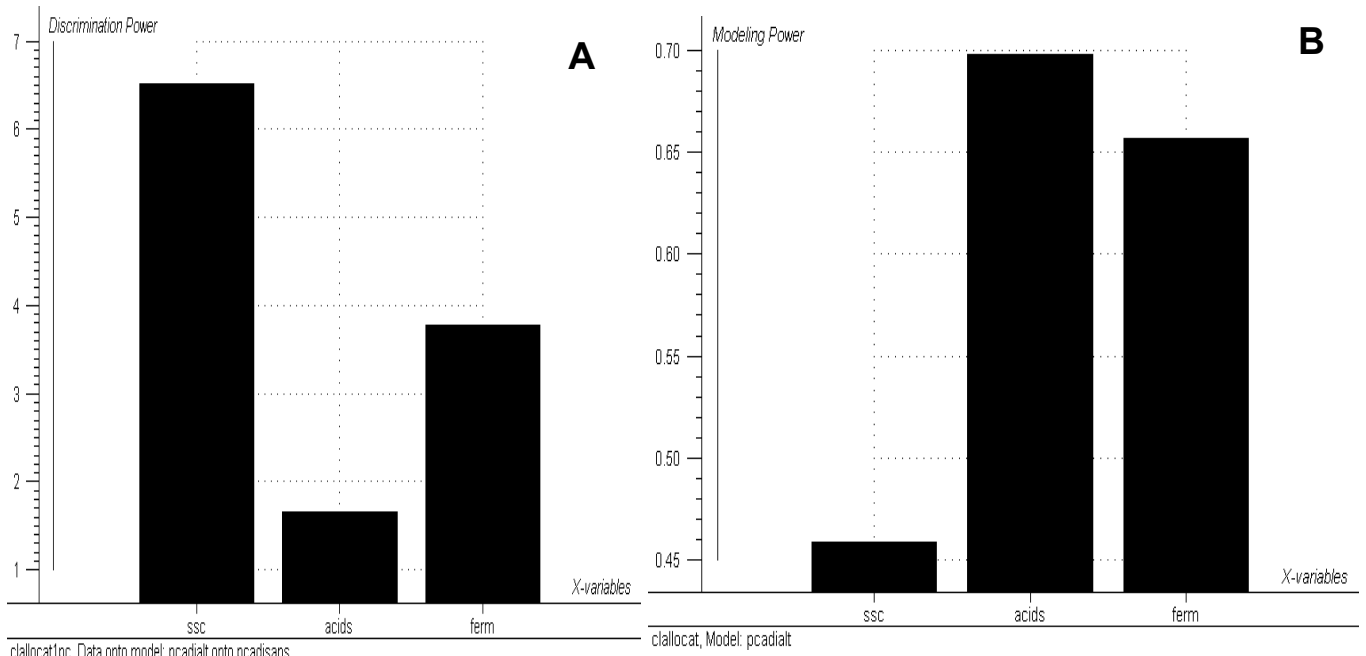
Encara que el resultat pot semblar contradictori, en realitat, no ho és. El fet que l'acidesa sigui la més important per a caracteritzar les dues classes, però que a la vegada no permeti diferenciar entre elles, vol dir que aquest paràmetre varia segons el mateix criteri en ambdues. En canvi, els SSC i la fermesa, importants també en tots dos casos i que alhora permeten la discriminació, semblen definits segons criteris inversos en cada classe. És a dir, els fruits alterats es podrien caracteritzar per nivells alts de SSC i baixos de fermesa mentre que els fruits sans ho podrien fer per nivells alts de fermesa i baixos de SSC. Això portaria a una discriminació entre ambdues classes. Aquest resultat suggereix que el llocat podria ser

una fisiopatia més aviat relacionada amb processos de senescència, fet que està àmpliament reconegut a la bibliografia (Herrero 1982; Herrero i Guàrdia 1992; Palazón 1984; Recasens 2000).

En funció d'aquests resultats, també se'n desprèn què es tracta de dues fisiopaties diferents. Faltaria comprovar si cadascuna d'elles impliquen processos bàsicament diferents o bé comporten els mateixos processos però amb diferent grau d'implicació.



**Figura 14 .-** Model de classificació per les mostres de llocat de la campanya 98/99. Gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits sans. 24 mostres i 3 variables han estat estudiades.



**Figura 15 .-** Model de classificació per les mostres de llocat de la campanya 98/99. (A) Gràfic del poder de discriminació entre ambdues classes. (B) Gràfic del poder de modelatge per als fruits alterats. 24 mostres i 3 variables han estat estudiades.

#### 4.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ EN FUNCIÓ DE PARÀMETRES RELACIONATS AMB DIFERENTS METABOLISMES

Finalment, es va estudiar el grau d'implicació de diferents metabolismes com l' antioxidant, el fermentatiu i el de l'etilè en el desenvolupament del llocat i del cor marró. Concretament, es va determinar la importància d'aquests metabolismes a través dels següents paràmetres:

- Els antioxidants, l'àcid ascòrbic i el glutatió.
- Els productes de la fermentació, l'acetaldehid i l'etanol.
- Els precursors de l'etilè, l'ACC i el MACC.

També es va realitzar la classificació per veure si era possible caracteritzar i posteriorment discriminar entre els fruits sans i aquells que presentaven alguna de les dues alteracions, a partir dels paràmetres anteriorment esmentats.

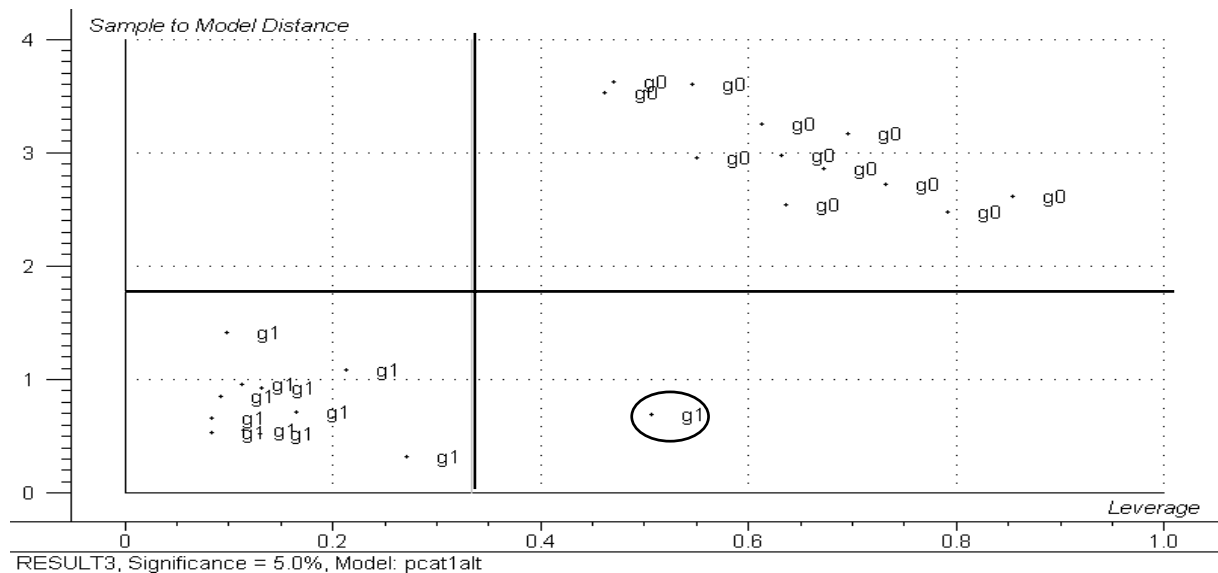
##### 4.1.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ PER AL LLOCAT

Els dos models, els quals estan construïts amb dos PC's i validats amb *full cross validation*, són significativament diferents segons indica el gràfic Model distance (distància entre models > 170 unitats, resultat no mostrat).

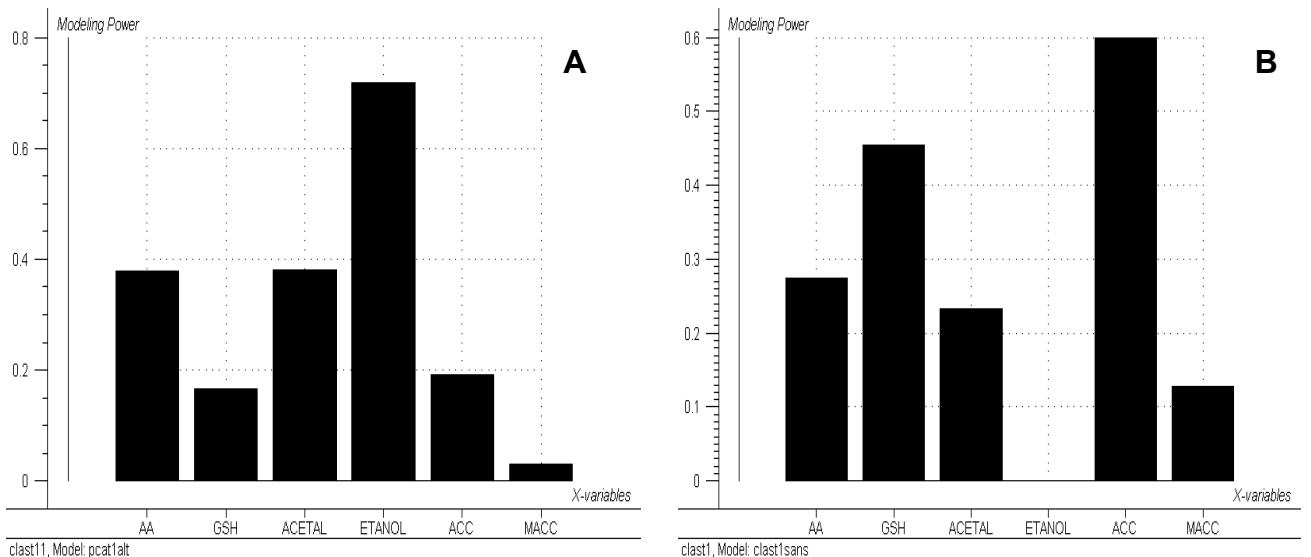
En el gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits danyats (Figura 16) s'observa que tots els fruits alterats, excepte un d'ells, estan correctament classificats a un nivell de significació del 5%. En el gràfic del poder de discriminació, s'observa que totes les variables són importants per a discriminar entre ambdues classes (resultat no presentat). Per això i per tal de caracteritzar cada classe, s'estudià el gràfic Modelling power per als fruits sans i per als fruits alterats. En el gràfic Modelling power per als fruits alterats (figura 17A) s'observa que la variable més important és el contingut d'etanol, seguida dels continguts d'acetaldehid i d'ascorbat (AA). En canvi, els fruits sans (figura 17B) estan altament caracteritzats pel contingut d'ACC i en menor grau pel contingut de glutatió (GSH). En aquest punt de l'estudi, sabem que aquestes variables són importants per a caracteritzar cada tipus de fruit però, es desconeix el tipus de correlació que presenten amb ells.

Estudiant de forma conjunta aquests resultats amb els obtinguts del model PLS, es pot concloure que el llocat està força relacionat amb els tres tipus de metabolismes. Segons diferents autors (De la Plaza, 1986; Herrero i Guàrdia, 1992 i Recasens 2000), aquesta alteració és un exemple de senescència accelerada després de períodes de frigoconservació perllongats en fred normal. En atmosfera d'alt contingut en  $CO_2$ , l'activació de la via fermentativa porta a la síntesi i a l'acumulació d'acetaldehid i d'etanol, productes que tenen una acció tòxica per al fruit (Pesis *et al.*, 1988). Segons Ganau *et al.* 1999, la incidència de l'alteració està íntimament relacionada amb la formació d'acetaldehid i d'etanol i concentracions d'aquest darrer superiors a 150 ppm, indiquen una predisposició a patir l'alteració. A més, aquest tipus d'atmosfera també és considerat com el causant d'un estrès oxidatiu (Larrigaudière *et al.*, 2001). Els resultats obtinguts en la caracterització dels fruits alterats semblen estar d'acord amb aquestes dues hipòtesis. Ara bé, a partir d'aquests resultats es perfila la hipòtesi de què el llocat en AC i en fred normal podria ser degut a mecanismes diferents, si més no, podria ser diferent el principal metabolisme que la desenvolupa. En fred normal apareix al final de la conservació i seria conseqüència del procés de senescència el qual, a la vegada implicaria la fermentació com a conseqüència de

la descomposició dels teixits. En canvi, en AC aquesta fisiopatia apareix abans dels tres mesos de conservació, amb el qual es fa més difícil relacionar-la amb un procés de senescència. En aquesta atmosfera, el llocat podria ser el resultat de la combinació de processos oxidatius i fermentatius, originats com a conseqüència de l'estrès provocat per un alt nivell de CO<sub>2</sub>. Alhora, aquest estrès seria més accentuat en aquells fruits que presenten un estat de maduresa més avançat. En definitiva, el llocat en aquest tipus d'atmosfera seria el resultat dels tres processos metabòlics.



**Figura 16.-** Model de classificació per les mostres de llocat. **Gràfic S<sub>i</sub> vs H<sub>i</sub> per als fruits alterats.** 24 mostres i 6 variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en un cercle de línies discontinües.

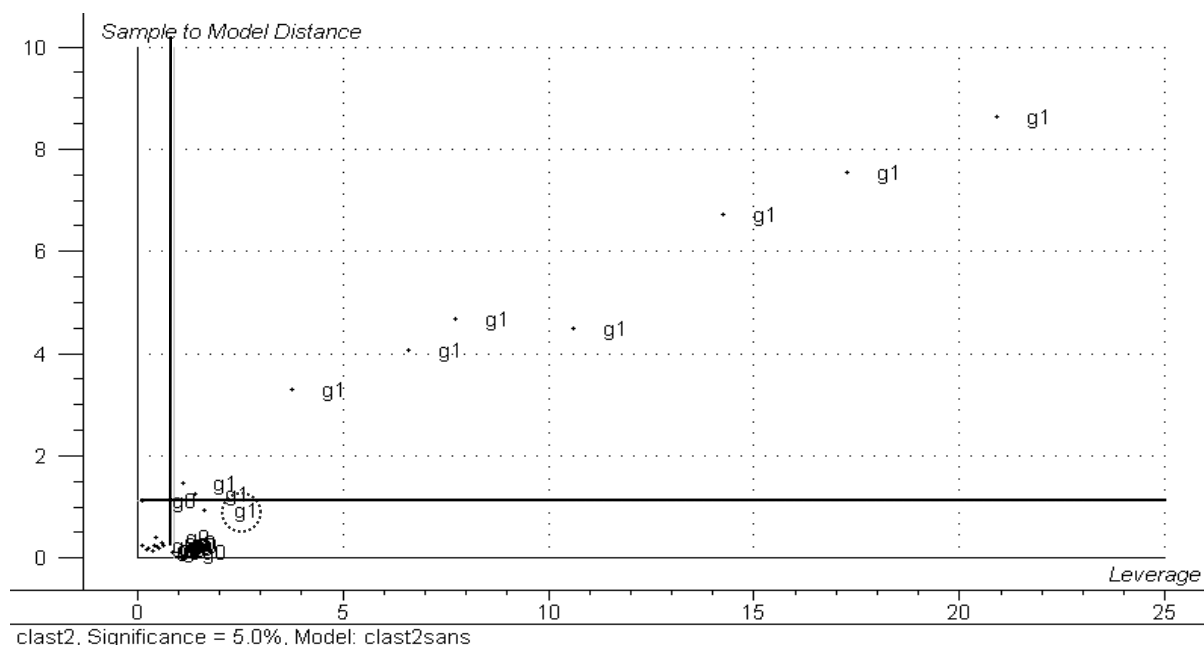


**Figura 17.-** Model de classificació per les mostres de llocat. **(A) Gràfic del poder de modelatge per als fruits alterats. (B) Gràfic del poder de modelatge per als fruits sans.** 24 mostres i 6 variables han estat estudiades.

#### 4.2.- MODEL DE CLASSIFICACIÓ PER AL COR MARRÓ

Els dos models, construïts amb dos PC's i validats amb *full cross validation*, són significativament diferents segons el gràfic *Model distance* (distància superior a 150 unitats, resultat no mostrat).

Si s'observa el gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits sans a un nivell de significació del 5%, es pot comprovar que tots els fruits sans estan correctament classificats i només dos fruits alterats pertanyen als dos models (figura 18). A partir del gràfic *Discrimination power* (figura 19A), es pot concloure que totes les variables, excepte el contingut de MACC, són importants per a diferenciar entre ambdues classes. Ara bé, la més important de totes elles és el contingut d'àcid ascòrbic seguida del contingut d'acetaldehid. Per tal de precisar més aquesta informació, s'estudia el gràfic *Modelling power* per als fruits alterats (figura 19B) i es compara amb el mateix gràfic per als fruits sans (figura 17B). De la figura 19B, se n'extreu que totes les variables són necessàries per a caracteritzar els fruits alterats però, l'àcid ascòrbic i l'etanol són marcadament les més importants.

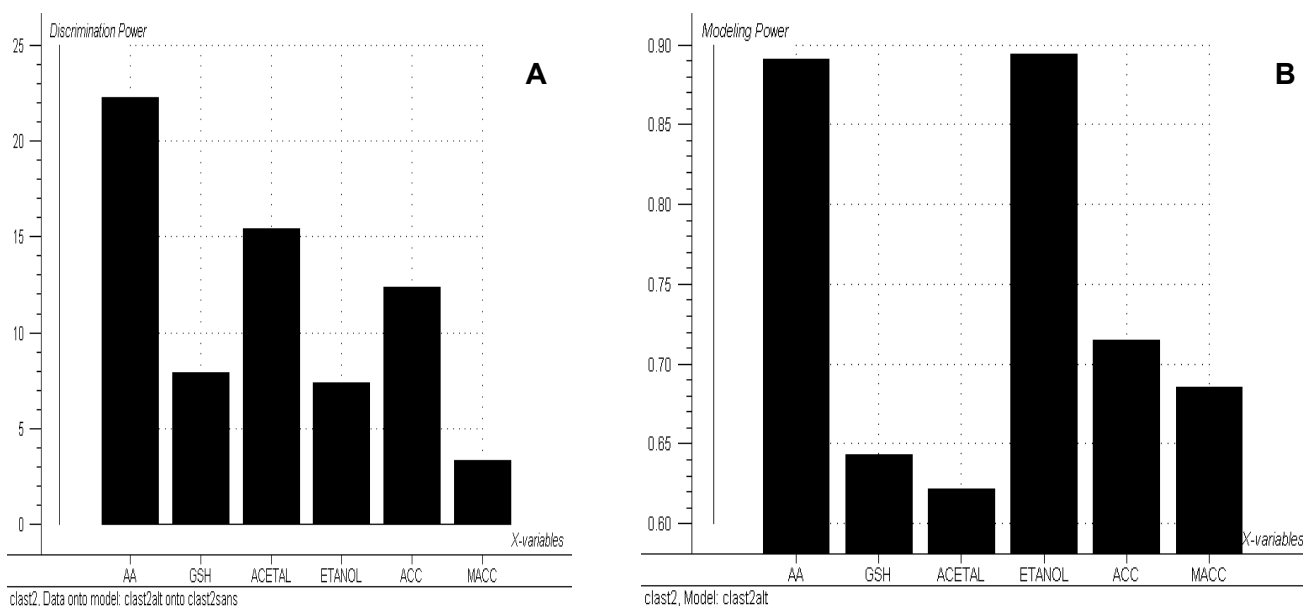


**Figura 18 .-** Model de classificació per les mostres de cor marró. Gràfic  $S_i$  vs  $H_i$  per als fruits alterats. 24 mostres i 6 variables han estat estudiades. Les mostres mal classificades es presenten en un cercle de línies discontinues.

A la vista d'aquests resultats es pot concloure que l'ascorbat juga un paper molt important en el desenvolupament del cor marró. En la varietat Conference i sota condicions d'AC, l'àcid ascòrbic disminueix considerablement (Larrigaudière *et al.*, 1998 i Eccher Zerbini *et al.*, 2002). L'anàlisi PLS de les mostres de cor marró durant dues campanyes consecutives també posava de manifest la importància d'aquesta disminució d'ascorbat. Segons Veltman *et al.* 1999 i 2000, aquesta disminució d'ascorbat condueix a danys oxidatius i a l'alteració de les membranes i finalment, a la incidència de cor marró. La marcada importància del contingut d'etanol, segons l'anàlisi PLS correlacionat positivament amb el desordre, pot ser una de les últimes conseqüències d'aquest procés oxidatiu, el qual sembla desencadenar el cor marró.

Aquests resultats posen de manifest un cop més que el llocat i el cor marró són dues fisiopaties diferents a nivell de grau d'implicació dels processos que hi intervenen.

Finalment comentar, que la classificació mitjançant paràmetres de qualitat no discrimina totalment entre fruits sans i fruits alterats. En canvi, la classificació mitjançant paràmetres bioquímics resulta ser força més acurada, malgrat que aquests paràmetres no són indicadors a utilitzar per a distingir els fruits sans dels alterats en la línia de la cooperativa. Assenyalar també, que la discriminació entre aquests dos tipus de fruits és més fàcil de realitzar en el llocat que en el cor marró.



**Figura 19** .- Model de classificació per les mostres de cor marró. **(A)** Gràfic del poder de discriminació entre ambdues classes. **(B)** Gràfic del poder de modelatge per als fruits alterats. 24 mostres i 6 variables han estat estudiades.



## REFERÈNCIES

- DE LA PLAZA, J.L. 1986. Corazón pardo en pera. *Fruticultura profesional*, 6: 9
- ECCHER ZERBINI, P., RIZZOLO, A., BRAMBILLA, A., CAMBIAGHI, P. 2002. Loss of ascorbic acid during storage of Conference pears in relation to the appearance of brown heart. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 : 1007-1013.
- GANAU, D., RECASENS, I., GRAELL, J. 1999. Influencia de la fecha de recolección en la descomposición interna (*Senescent breakdown*) de peras Blanquilla durante su frigoconservación. *Actas de Horticultura*, nº 27(4), 280-286.
- HERRERO, A. 1982. *Enfermedades y fisiopatías de peras y manzanas en conservación frigorífica*. Ed. Dilagro. Lleida.
- HERRERO, A I GUARDIA, J. 1992. *Conservación de frutos. Manual Técnico*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- LARRIGAUDIÈRE, C., LENTHERIC, I., VENDRELL, M. 1998. Relationship between enzymatic browning and internal disorders in controlled-atmosphere stored pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78: 232-236.
- LARRIGAUDIÈRE, C., LENTHERIC, I., PINTÓ, E., VENDRELL, M., 2001. Short-term effects of air and controlled atmosphere storage on antioxidant metabolism in conference pears. *Journal of Plant Physiology*, 158: 1015-1022.
- PALAZÓN, I. 1984. *Estudio de los problemas patológicos de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza*. Ed. Diputación Provincial de Zaragoza. Institución Fernando El Católico, Publi. 990, pp 147.
- PESIS, E., LEVI, A., BEN ARIE, R. 1988. Role of acetaldehyde in the removal of astringency from persimmon fruits under various modified atmospheres. *Journal of the Food Science*, 53: 153-156.
- RECASENS, I. 2000. Alteraciones fisiológicas de la fruta durante la poscosecha. *Post-recolección de Frutos y Hortalizas. V Simposio Nacional y II Ibérico*. pp. 165-174.
- VELTMAN, R., PEPPELENBOS, H. 1998. Healthy Conference pears in CA storage thanks to vitamin C. *Fruittelt*, 22:14-15.
- VELTMAN, R., SANDERS, MG., PERSIJN, ST., PEPPELENBOS, HW., OÖSTERHAVEN, J. 1999. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. Cv. Conference). *Physiologia Plantarum*, 107: 39-45.
- VELTMAN, R., KHO, RM., VAN SCHAİK ACR., SANDERS, MG., OOSTERHAVEN, J. 2000. Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. Cvs. *Rocha* and *Conference*) under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 129-137.



---

## IV . DISCUSSIÓ GENERAL

---

## DISCUSSIÓ GENERAL

### **1.- Manifestació del cor marró i del llocat en pera Blanquilla. Efecte de diferents atmosferes de conservació i de la data de collita en el desenvolupament d'aquestes dues alteracions**

En aquesta varietat el llocat va aparèixer en l'atmosfera de fred normal i en l'atmosfera controlada d'alt contingut de CO<sub>2</sub>. En canvi, el cor marró solament es va presentar en aquesta darrera cambra. En l'AC de baix nivell de CO<sub>2</sub> no van aparèixer cap de les dues alteracions. A partir d'aquests resultats es torna a posar de manifest la sensibilitat que té aquesta varietat a altes concentracions de CO<sub>2</sub>. En general, aquesta sensibilitat es dona quan el percentatge de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera de conservació sobrepassa el llindar de tolerància del fruit (Herrero 1982; Herrero i Guàrdia, 1992; Palazón 1984; Bondoux 1994; Recasens, 2000). Per De la Plaza (1973) i Herrero i Guàrdia (1992) aquest llindar en la pera Blanquilla es dona a partir d'una concentració de CO<sub>2</sub> en els teixits de 100 mg per cada 100 g de fruit. Els nostres resultats confirmen que la concentració d'aquest gas en l'atmosfera de conservació és un dels principals factors que condueixen a l'aparició del cor marró. Aquests mateixos resultats reflecteixen que la concentració d'anhídrid carbònic també seria un dels factors causants però no determinant del llocat, resultat que no semblen indicar els autors anteriors. Segons aquests autors, a excepció de De la Plaza (1973), el llocat apareix solament en l'atmosfera de fred normal després de períodes de conservació perllongats. Els nostres resultats confirmen aquest fet, ja que el llocat també apareix en l'atmosfera de fred normal al final del període de conservació. En definitiva, es pot concloure que la concentració de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera de conservació és un factor causant molt important d'aquestes dues fisiopaties. Però segurament no és l'únic ni el més important, sobretot pel llocat.

Una altra característica que diferencia ambdues fisiopaties és el fet que apareixen en temps diferents durant el període de conservació. En l'AC d'alt CO<sub>2</sub>, el llocat apareix als 3 mesos de conservació o amb anterioritat a aquesta data, mentre que el cor marró es presenta després d'aquest període. Aquest resultat s'ha pogut comprovar durant les tres campanyes d'estudi. En canvi, aquest fet no s'ha observat en l'atmosfera de fred normal en la qual el llocat s'ha manifestat al final del procés de frigoconservació. A partir d'aquí es pot plantejar la hipòtesi que el cor marró i el llocat podrien ser una mateixa alteració amb manifestacions diferents en el temps. Ara bé, són el llocat i el cor marró dos estadis diferents d'una mateixa alteració o bé són dos desordres diferents? D'acord amb els nostres resultats els dos desordres són diferents, ja que els símptomes sempre apareixen separadament. Pràcticament, cap de les peres afectades per llocat presenta cavitats i, alhora, cap de les afectades per cor marró presenten els típics símptomes del llocat. En contraposició, De la Plaza (1986) i Bondoux (1994) descriuen el cor marró com dos estadis diferents. Segons ells, el cor marró es presentaria en un primer estadi com un enfosquiment pericarpel·lar de tipus humit i, en un segon estadi, s'estendria al parènquima cortical i evolucionaria donant lloc a les típiques cavitats del cor marró. La resta d'autors esmentats anteriorment fan referència a dues fisiopaties diferents amb símptomes específics. Per tal de donar resposta a aquesta pregunta, s'aprofundirà després en el mecanisme o mecanismes desencadenants d'aquestes alteracions.

El segon factor que determina tant el llocat com el cor marró és el grau de maduresa en què els fruits són recol·lectats. La incidència d'aquestes dues alteracions en els fruits provinents de recol·leccions tardanes, és molt superior a la que presentaven els fruits recol·lectats en un estat de maduresa més precoç. Aquest resultat es va donar en els tres tipus d'atmosferes i en les tres campanyes d'estudi. En l'AC de baix CO<sub>2</sub> solament van desenvolupar el cor marró un percentatge petit de fruits provinents de recol·leccions tardanes. En contraposició, en les atmosferes d'alt CO<sub>2</sub> i de fred normal, una major maduresa a la collita es va associar a una major incidència de cor marró i de llocat així com a una major severitat d'aquestes. A més, la manifestació de les dues alteracions es va veure accelerada en el temps. Aquests resultats confirmen els observats per altres autors en pera Conference (Pierson *et al.*, 1971; Lenthéric *et al.*, 1999; Roelofs i De Jager, 1997; Veltman 2002) i en poma Fuji (Grant *et al.*, 1996). Malgrat tot, està per conèixer la base bioquímica que explicaria la influència que té el grau de maduresa a la recol·lecció en la incidència d'aquests desordres. Segons Lenthéric *et al.* (1999) la data de collita en peres Conference afecta al sistema antioxidant del fruit i pot explicar la susceptibilitat dels fruits més madurs a patir desordres. Els nostres resultats també confirmen aquesta teoria, ja que els fruits més madurs presentaven un menor contingut d'ascorbat i una menor activitat de la CAT i l'APX a la collita (resultats no presentats).

A més d'aquests factors, n'hi ha altres d'importants com són la temperatura i la concentració d'oxigen (Bertolini *et al.* 1997; Veltman *et al.* 2002). Segons els nostres resultats, aquests no semblen ser les causes determinants dels desordres, però sí factors que accentuen l'acció dels anteriors. Per exemple, en moltes varietats de poma l'enfosquiment intern és causat principalment per un alt nivell de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera de conservació (Brackmann i Saquet, 1995), el qual es veu accentuat per altres factors com una baixa temperatura (Meherink *et al.* 1984; Lau *et al.* 1987), un baix nivell d'oxigen (Lau *et al.* 1987) o un elevat grau d'humitat (Brackmann *et al.* 1995).

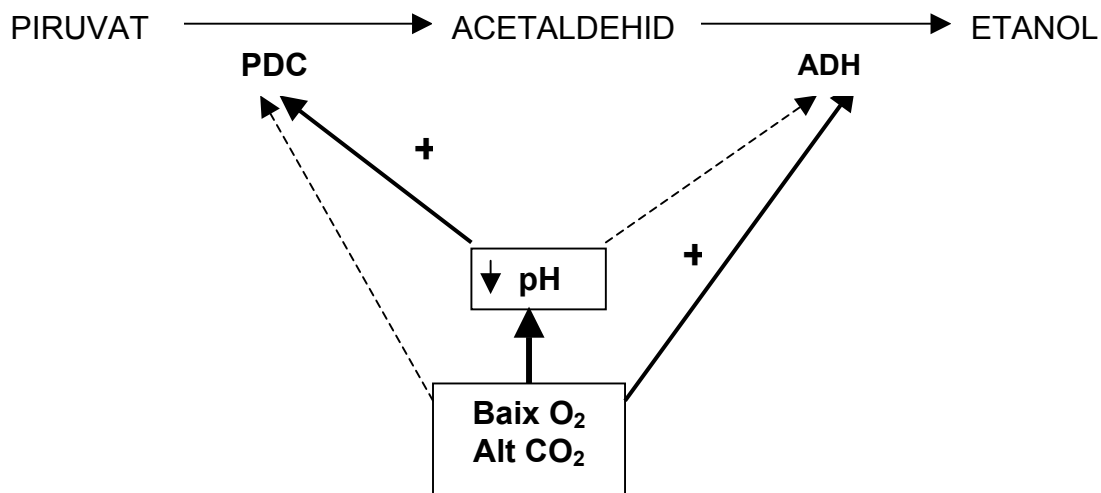
## **2.- Efectes del CO<sub>2</sub> sobre alguns processos fisiològics probablement involucrats en el desenvolupament del cor marró i del llocat**

Encara es desconeixen les causes per les quals alts nivell de CO<sub>2</sub> condueixen a aquestes dues alteracions, però sí són coneguts els efectes d'aquest gas sobre alguns processos fisiològics. Altes concentracions de CO<sub>2</sub> alenteixen la respiració en inhibir, entre altres, l'activitat de l'enzim succinat deshidrogenasa, la qual provoca l'acumulació d'un compost tòxic per als teixits, l'àcid succínic (Hulme 1956; Williams i Patterson, 1964, Watkins i Zhang, 1998). Aquest fet de forma aïllada no explica els danys per CO<sub>2</sub>. Per exemple, en enciam es van donar danys per CO<sub>2</sub> a temperatures inferiors a 10° C, mentre que l'àcid succínic en aquesta espècie s'acumulava solament a temperatures entre 10 i 15° C (Siriphanich i Kader, 1986). De la mateixa manera, Frenkel i Patterson (1977) van trobar que un nivell elevat de CO<sub>2</sub> (superior al 5%) disminuïa l'activitat de la succinat deshidrogenasa i causava la desintegració dels plastidis, dels vacúols i de la matriu citoplasmàtica en peres Barlett. Aquest resultat és interessant ja que pot explicar com es dur a terme el procés de descompartimentació, procés que com veurem està directament implicat en el cor marró.

El CO<sub>2</sub>, a més, influeix en altres parts del procés de la respiració, més concretament, en la glicòlisi i en la cadena de transport d'electrons. Segons Kerbel *et al.* (1988), les peres Barlett emmagatzemades en alt CO<sub>2</sub>, acumulen fructosa-6-fostat mentre que es redueixen els nivells de fructosa-1,6-difosfat. Aquest fet suggereix que aquest gas inhibeix l'activitat de la fosfofructokinasa. També es conegut que un alt nivell de CO<sub>2</sub> inhibeix l'acció del citocrom c-

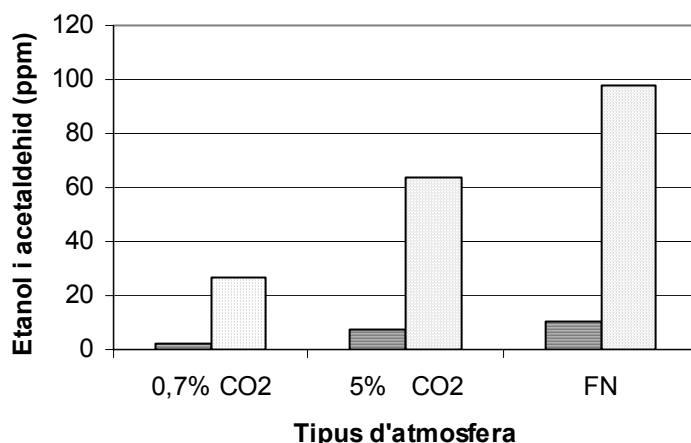
oxidasa (Bendall *et al.*, 1958; González-Meler *et al.*, 1996). En ambdós casos, s'observa una disminució de la respiració però no s'expliquen els danys per CO<sub>2</sub>. Aquests danys poden ser originats per una conseqüència derivada de la disminució de la respiració, com per exemple, una baixa producció d'ATP. Alguns autors han associat aquestes fisiopaties amb un baix nivell d'ATP i amb un baix rati d'ATP/ADP, i han mostrat que la insuficient disponibilitat d'energia pot ser un factor fonamental per a explicar la incidència del llocat i del cor marró (Saquet *et al.*, 2000; Nanos i Kader, 1993; Lange i Kader, 1997). Segons Veltman *et al.* 2002, en peres Conference sota condicions d'elevat CO<sub>2</sub>, cap dels paràmetres anteriors pot causar aïlladament el cor marró; però l'acció combinada d'aquests factors (i altres) sí poden determinar la incidència d'aquest desordre.

La respiració anaeròbica (fermentació) és una de les principals vies metabòliques que s'indueixen en els teixits de les plantes com a resposta a baixos nivells d'O<sub>2</sub> i/o a alts nivells de CO<sub>2</sub> (Ke *et al.*, 1993; Ke *et al.*, 1994). La influència d'aquest tipus d'atmosfera en el procés de la fermentació es pot observar en la figura 1.



**Figura 1.-** Regulació del procés de la fermentació sota condicions de baix O<sub>2</sub> i/o alt CO<sub>2</sub> en peres Barlett (Ke *et al.*, 1994). PDC=Piruvat descarboxilasa i ADH=Alcohol deshidrogenasa.

La presència d'acetaldehid i etanol, productes de la fermentació, sembla que forma part del procés natural de maduració dels fruits (Ke *et al.*, 1994; Nanos *et al.*, 1992). La concentració d'etanol en peres Barlett, sota condicions d'hipòxia, augmenta significativament a alts nivells de CO<sub>2</sub> (Ke *et al.*, 1994). Aquest resultat pot reflectir un canvi de la respiració aeròbica a l'anaeròbica, induït per un alt nivell de CO<sub>2</sub>. Aquesta resposta adaptativa té com a objectiu compensar la inhibició de la respiració i produir, almenys parcialment, l'energia necessària per al funcionament de la cèl·lula. Els nostres resultats confirmen aquesta teoria ja que en l'atmosfera amb una concentració de CO<sub>2</sub> del 5%, els continguts d'acetaldehid i d'etanol van ser significativament superiors als que es van donar en l'atmosfera del 0,7% de CO<sub>2</sub> (Figura 2). Malgrat tot, els valors més elevats en etanol i acetaldehid es van presentar sota condicions de normòxia (Figura 2). Aquest fet es pot atribuir a l'estat avançat de senescència que presentaven aquests fruits.



**Figura 2.** Influència del tipus d'atmosfera sobre les concentracions d'acetaldehid (amb ratlles) i d'etanol (amb punts) en peres Blanquilla després de 6 mesos de conservació. La concentració d'ambdós s'expressa en ppm.

El CO<sub>2</sub> també pot afectar a altres processos com són la maduració i la senescència del fruit, els quals no són resultat directe dels efectes del CO<sub>2</sub> sobre la respiració (Ben-Aire *et al.*, 1993) sinó més aviat sobre la producció de l'etilè. El CO<sub>2</sub>, com se sap, és un supressor de la producció d'etilè (Watkins i Zang, 1998). Malgrat que l'acció del CO<sub>2</sub> en la biosíntesi de l'etilè ha estat àmpliament estudiada, es desconeix encara si existeix alguna relació entre el metabolisme de l'etilè i la incidència d'aquestes dues alteracions fisiològiques. Dels nostres resultats se'n desprèn que el metabolisme de l'etilè no està relacionat amb la incidència del cor marró (Capítol 5). En canvi, l'anàlisi PLS per al llocat posa de manifest que aquest metabolisme sí està involucrat en el desenvolupament d'aquest desordre. El llocat està correlacionat positivament amb els continguts d'ACC i de MACC; el que sembla confirmar parcialment la hipòtesi que el llocat és una alteració relacionada amb el procés de senescència.

Un altre efecte descrit del CO<sub>2</sub> és la generació d'àcid carbònic i com a conseqüència la disminució del pH intracel·lular (Siriphanich i Kader, 1986; Watkins i Zhang, 1998). Brown (1985) va indicar que això es donava a concentracions de CO<sub>2</sub> superiors al 5%. En peres Barlett conservades en fred normal el pH citoplasmàtic ha estat estimat en 7,4, mentre que sota condicions d'elevat CO<sub>2</sub>, el pH citoplasmàtic disminueix per sota de 6,6 (Nanos i Kader, 1993). Els nostres resultats també corroboren aquesta disminució del pH quan els fruits són conservats sota condicions d'alt CO<sub>2</sub> (dades no presentades). Ara bé, aquesta disminució del pH pot ser que no solament sigui un efecte de l'alta concentració de CO<sub>2</sub> sinó que també sigui un símptoma del procés de descompartimentació que es dona en aquest tipus d'atmosfera. Alhora, aquesta acidificació del citoplasma afavorirà l'acció de la PPO i conseqüentment el procés d'enfosquiment enzimàtic.

### 3.- Bioquímica del cor marró i del llocat. Comprovació de les diferents hipòtesis plantejades

#### 3.1.- El paper del metabolisme fermentatiu en el desenvolupament del cor marró i del llocat

Una de les possibles causes del desenvolupament d'aquests desordres pot ser l'activació de la via fermentativa, més concretament, l'increment dels productes de la fermentació i la insuficient energia proporcionada per aquesta via, hipòtesi que vol ser comprovada en aquest estudi.

Pesis *et al.* (1988) i Volz *et al.* (1998) van mostrar que el CO<sub>2</sub> conduïa a una acumulació d'etanol i acetaldehid en els teixits danyats. Altres autors (Lidster *et al.*, 1990; Kader 1986) van associar els canvis en la fermentació amb l'enfosquiment dels teixits i la mort cel·lular. Els nostres resultats, però, solament estan parcialment d'acord amb aquestes teories. D'una banda, hem observat que els fruits danyats en comparació amb els fruits sans presentaven valors significativament més elevats tant d'acetaldehid com d'etanol. En aquests també es va donar un increment notable en l'activitat de l'ADH però no en l'activitat de la PDC. L'activitat de la PDC, a diferència del que va observar Chen (2000) en peres Anjou, no podrà utilitzar-se com a marcador d'aquests desordres en pera Blanquilla. Segons aquest autor, l'activitat de la PDC es pot utilitzar com a marcador bioquímic en la predicció dels desordres SBS (taques negres a la pell) i PBC (cor marró i sucós) en peres Anjou. D'altra banda, peres conservades en fred normal i no danyades, acumulaven nivells més elevats d'etanol i d'acetaldehid (Pintó *et al.*, 2001). Aquestes peres, com ja s'ha comentat anteriorment, presentaven un avançat estat de maduració. A més, dins d'aquesta atmosfera les concentracions més elevades d'etanol es van donar en els fruits que presentaven els primers símptomes de llocat.

En arribar a aquest punt, se'ns plantegen tres possibles qüestions a les quals encara no som capaços de donar resposta: 1- L'acumulació dels productes de la fermentació és una causa o una conseqüència de l'alteració? 2- Si és una causa, quin grau d'implicació té aquesta via metabòlica en el desenvolupament dels desordres? 3- Està implicat de manera diferencial aquest metabolisme en els dos desordres?

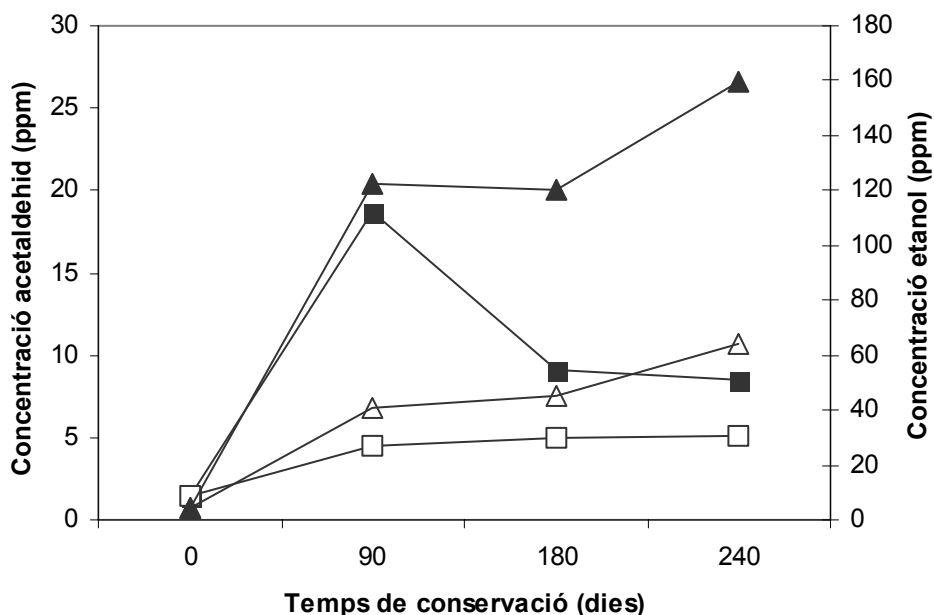
Si revisem els resultats obtinguts en l'anàlisi multivariant, sembla que es pot parlar de dos desordres diferents, provocats també per causes diferents o per diferent grau d'implicació d'aquestes (Capítol 3 i 5). A nivell del metabolisme fermentatiu, el llocat està fortament anticorrelacionat amb l'activitat de l'ADH. En general, increments en les activitats de la PDC i de l'ADH no sempre es poden correlacionar amb increments dels seus respectius productes (Ke *et al.*, 1994). Per Chervin *et al.* (1999) cap d'aquests dos enzims és un factor limitant per l'acumulació d'etanol en peres Barlett. En el nostre estudi, la disminució de l'activitat de l'ADH sí que ha conduït a una acumulació d'acetaldehid en les peres alterades per llocat (Figura 3). L'acetaldehid des de molt antic s'ha perfilat com un compost més tòxic que l'etanol (Thomas 1928). Aquest compost sembla afectar el metabolisme secundari (Ricard *et al.*, 1994) i pot reaccionar amb les proteïnes interferint la funcionalitat d'enzims essencials (Chervin *et al.*, 1996). Els resultats de l'anàlisi de classificació per al llocat (Capítol 6), també mostren que aquest desordre està correlacionat amb els continguts tant d'acetaldehid com d'etanol.



El conjunt dels nostres resultats semblen confirmar la hipòtesi que els continguts d'acetaldehid estan relacionats amb el llocat de la pera Blanquilla. Però aquests canvis són la causa o la conseqüència de l'alteració? Es pot pensar que l'elevat contingut d'acetaldehid, considerant la seva toxicitat, podria ser una possible causa del llocat. En canvi, l'acumulació d'etanol pot ésser més aviat una conseqüència del propi procés de descomposició dels teixits.

El cor marró solament està associat a l'acumulació d'etanol, especialment al final del procés, que és quan es dona un major percentatge d'alteració en les mostres (Figura 3). Aquest resultat s'ha pogut comprovar també en l'anàlisi mitjançant PLS (Capítol 5). Segons aquests resultats, es pot pensar que els alts continguts d'etanol que es donen en el cor marró són més una conseqüència que no pas una causa de l'alteració.

No oblidem que l'activació de la via fermentativa origina canvis en el metabolisme energètic, els quals probablement també estaran implicats en el desenvolupament dels desordres. Roberts *et al.* (1984) i Peppelenbos i Oösterhaven (1998) han associat una insuficient producció d'energia, que no podria mantenir els processos cel·lulars, amb danys en els teixits. Segons Otma (2001), la disminució dels nivells d'ATP (ATP produït – ATP necessari) sembla ser un factor determinant del cor marró en peres Conference. De la mateixa manera, Saquet *et al.* (2000) van relacionar la incidència del cor marró amb una disminució dels nivells d'ATP. En canvi, per aquests autors no hi ha relació entre la concentració del nucleòtid piridina (NADH) i la incidència dels desordres. Els nostres resultats també confirmen aquesta teoria ja que no s'han observat diferències en el rati NAD/NADH pels fruits sans i pels fruits alterats (resultat no presentat).



**Figura 3.-** Evolució de la concentració d'acetaldehid (quadrats) i d'etanol (triangles) en peres sanes (figures buides) i peres alterades (figures plenes). Totes les mostres provenen de l'atmosfera d'alt contingut de CO<sub>2</sub> i la tercera campanya d'estudi (Capítol 2). Recordem que el llocat es dona als tres mesos de conservació i posteriorment apareix el cor marró.

### 3.2.- El paper del metabolisme antioxidantiu en el desenvolupament del cor marró i del llocat. Efecte protector dels antioxidants naturals

L'AC d'alt CO<sub>2</sub> pot ésser considerada com un estrès ambiental, el qual es pot veure agreujat per l'acció combinada d'altres factors, com són una baixa temperatura i una baixa concentració d'O<sub>2</sub> (Larrigaudière *et al.*, 2001b). Per exemple, un estrès provocat per baixes temperatures porta a l'acumulació d'espècies actives de l'oxigen (AOS), com l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> i el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Prasad *et al.*, 1994), les quals poden causar de forma indiscriminada la peroxidació dels lípids de la membrana i la desnaturalització de proteïnes, amb tot el que això comporta (Halliwell i Gutteridge, 1989). Burmeister i Dillely (1995) van suggerir que el mecanisme causant dels danys per CO<sub>2</sub> en pomes Empire era un radical lliure que catalitzava l'oxidació dels aminoàcids de les proteïnes i dels lípids de les membranes. Per tant, l'habilitat que tingui el fruit per a eliminar i/o metabolitzar els radicals lliures i les AOS, pot ser un element molt important i fins i tot determinant per a prevenir l'aparició dels desordres. Segons Litchentaler (1996), les plantes responen a les situacions d'estrès activant el seu metabolisme antioxidant. L'activació d'aquest metabolisme podrà comportar canvis quantitius i qualitius en el nivell dels antioxidants (ascorbat i glutatió), un increment de les activitats dels enzims antioxidants (SOD, CAT i APX) i, finalment, si aquests mecanismes no són prou eficaços, l'acumulació d'AOS i/o de peròxids. Tots aquests punts seran els que analitzarem amb profunditat en aquest apartat.

El primer punt que analitzem és veure si l'AC d'alt CO<sub>2</sub> condueix a l'estrès oxidatiu. Els nostres resultats mostren que el contingut d'ascorbat disminueix ràpidament durant els primers dies de conservació en totes les atmosferes de conservació i de forma molt més acusada en l'AC d'alt CO<sub>2</sub> (Larrigaudière *et al.*, 2001a). El comportament en un segon període és marcadament diferent en funció del tipus d'atmosfera. Mentre que en l'atmosfera de fred normal l'ascorbat és regenerat en la seva totalitat i parcialment en l'AC de baix CO<sub>2</sub>, en l'AC d'alt CO<sub>2</sub> es manté a nivells molt baixos sense ser regenerat. En canvi, el glutatió primer es manté constant i després s'incrementa; presenta continguts similars en les tres atmosferes, per tant, no sembla pas que sigui un factor limitant. Aquest primer resultat ja ens indica la poca capacitat que tindran els fruits conservats en l'atmosfera d'alt CO<sub>2</sub> per a fer front a l'estrès oxidatiu.

El sistema de protecció via enzimàtica sembla activat en l'AC però no pas en l'atmosfera de fred normal. Els fruits conservats en AC mostren un increment significatiu en les activitats de la CAT i l'APX, la qual cosa indica que s'està metabolitzant el peròxid d'hidrogen per aquestes dues vies. A més, en l'AC d'alt CO<sub>2</sub> es presenta un increment notable de l'activitat de la SOD, fet que permet la metabolització del radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En aquesta atmosfera tenim, doncs, en comparació amb la de baix CO<sub>2</sub>, una major concentració de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la qual, en principi, sembla eliminar-se via CAT i via APX. L'anàlisi del contingut de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posa de manifest aquest increment de la concentració en l'AC d'alt CO<sub>2</sub> durant el primer període de conservació (resultat no mostrat). Però la qüestió és, podrà eliminar-se aquest compost via APX si els nivells d'ascorbat són baixos i no es regeneren? El fet que el contingut de glutatió s'incrementi i que l'activitat de la GR romanguí constant reflecteix que el cicle AA-GSH pot no ser completament operatiu. Si analitzen les activitats de la DHAR i de la MDHAR en aquesta atmosfera, es pot observar que l'activitat d'aquests enzims és significativament inferior a la que hem observat en l'AC de baix CO<sub>2</sub> (resultat no presentat). Ambdós resultats i l'increment del rati DHA/AA que hem observat, indiquen una acumulació de la forma oxidada de l'ascorbat (DHA). El canvi en l'estat reductor de l'AA és un indicador clar de l'existència d'estrès oxidatiu (Larrigaudière *et al.*, 2001b), el qual està correlacionat, almenys parcialment, amb la sensibilitat que té la varietat Blanquilla a un alt nivell de CO<sub>2</sub>.

Per tal de comprovar la hipòtesi que s'acaba de plantejar, s'han estudiat aquests mecanismes de defensa en els fruits sans i alterats. En general, els fruits alterats presenten una important disminució del contingut d'àcid ascòrbic (21% del valor inicial) la qual, ha pogut conduir a danys oxidatius (Pintó *et al.*, 2001). Cal recordar que el substrat més important per a detoxificar el  $H_2O_2$  és l'ascorbat (Melhorn *et al.*, 1996), i l'enzim més eficient per aquesta conversió és l'APX (Noctor i Foyer, 1998). L'activitat de l'APX en els fruits alterats en comparació amb la que es dona en els fruits sans és significativament més baixa, fet que posa de manifest una menor capacitat de metabolització del  $H_2O_2$ . A més, els fruits danyats presentaven un notable increment de l'activitat de la SOD i una important disminució en l'activitat de la CAT, fet que condueix també a una acumulació de peròxid d'hidrogen. En aquest context, sembla que el fruit ha perdut la seva capacitat per a previndre els danys oxidatius i, per tant, és quan poden aparèixer els problemes de peroxidació (Pintó *et al.*, 2001).

Aquesta hipòtesi pot ésser confirmada per cadascuna de les alteracions a partir dels resultats obtinguts en l'anàlisi multivariant. En aquesta anàlisi (Capítols 3 i 5), es posava de manifest la importància que té el mecanisme antioxidant en el desenvolupament dels dos desordres. En el cas del cor marró, les activitats de la CAT i de l'APX juntament amb el contingut d'àcid ascòrbic, són factors fonamentals i determinants per al desenvolupament del desordre. L'activitat d'aquests dos enzims va ésser altament anticorrelacionada amb el grau d'alteració. El contingut d'ascorbat també és un factor molt important, i potser més que els anteriors, en el desenvolupament del cor marró. Està àmpliament reconegut en la bibliografia que una disminució en el contingut d'ascorbat pot conduir a la peroxidació de les membranes, a la descompartimentació i finalment a l'enfosquiment intern (Chervin *et al.*, 1996; Lenthéric *et al.*, 1999).

En el cas del llocat, els mecanismes antioxidants també són importants però potser, no són tan determinants. El llocat està també anticorrelacionat amb el contingut d'àcid ascòrbic i amb l'activitat d'aquests dos enzims, principalment amb la de la CAT. A més, l'anàlisi PLS dut a terme per a aquesta fisiopatia, ens indica que el grau d'implicació d'aquests factors és important, però, a diferència del cor marró, no pas més important que la resta de metabolismes implicats.

Després d'aquesta anàlisi es posa de manifest la importància que té el contingut d'ascorbat a l'hora de determinar la incidència d'aquests desordres, especialment el cor marró. Per alguns autors com Eccher Zerbini *et al.* (2002) i Veltman *et al.* (1999b i 2000), el contingut d'àcid ascòrbic pot ser el factor determinant en el desenvolupament del desordre. Però, per què és tan important el contingut d'àcid ascòrbic? Aquest no solament intervé com a donador d'electrons en l'eliminació del  $H_2O_2$  del cloroplast via APX, sinó que també pot neutralitzar directament els radicals lliures per reacció amb ells o bé pot intervindre en la regeneració de la vitamina E. La vitamina E protegeix les membranes de l'acció dels radicals lliures ja que reacciona amb els peròxids dels lípids i acaba així amb el procés de peroxidació (Veltman, 2002). Experiments *in vitro* han fet palès que en la regeneració de la vitamina E hi intervenen de forma conjunta l'AA i el GSH (Thomas *et al.*, 1992). A més, l'AA pot evitar directament l'enfosquiment enzimàtic ja que pot regenerar els o-fenols a partir de les o-quinones (Veltman *et al.*, 1999a i 2000).

Una altra qüestió que encara queda oberta és: per què es degrada tan ràpidament l'àcid ascòrbic en condicions d'alt  $CO_2$ ? Per a respondre aquesta pregunta es poden plantejar dues hipòtesis: 1- La reducció en el contingut d'AA és deguda a la seva oxidació i posterior degradació en oxalat i tartrat; 2- Els baixos nivells d'AA són deguts a una inhibició en la seva biosíntesi.

Malgrat que els nostres resultats (inhibició parcial de l'activitat de la MDHAR i de la DHAR a alts nivells de CO<sub>2</sub> i augment de la forma oxidada de l'ascorbat) vagin a favor de la primera hipòtesi, no es pot descartar també una possible inhibició a nivell de la seva via de síntesi.

El fet que aquest compost es degradi tan ràpidament al principi, fa pensar que la disminució d'AA no és una conseqüència sinó la causa, o una de les causes, del cor marró. Aquesta teoria es recolza en el fet que la disminució d'AA pot ser reversible si s'anul·len les condicions que han conduït a aquesta disminució (Veltman *et al.*, 1999b). Per Eccher Zerbini *et al.* (2002) i Veltman *et al.* (1999b i 2000), el cor marró solament es dona quan el contingut d'AA disminueix per sota d'un determinat nivell. Malgrat tot, l'AA no és segurament l'únic factor que pot explicar el cor marró. Un baix contingut d'ascorbat pot també actuar de forma més indirecta sobre altres processos com la peroxidació de les membranes.

### **3.3.- El paper de la peroxidació de les membranes en el desenvolupament del cor marró i del llocat**

En els fruits conservats en AC d'alt CO<sub>2</sub>, l'estat de peroxidació mesurat, com el contingut d'età produït i el contingut de MDA i 4-HNE, ha estat efectivament superior a l'estat de peroxidació que presentaven els fruits de les altres dues atmosferes (Larrigaudière *et al.*, 2001a). A partir d'aquí es poden relacionar altes concentracions de CO<sub>2</sub> amb un major grau de peroxidació de les membranes. Aquestes dades es veuen corroborades per l'activitat de la LOX, la qual en els fruits conservats sota alt CO<sub>2</sub>, presentava durant el primer període de conservació una activitat molt superior a la dels fruits conservats en les altres atmosferes.

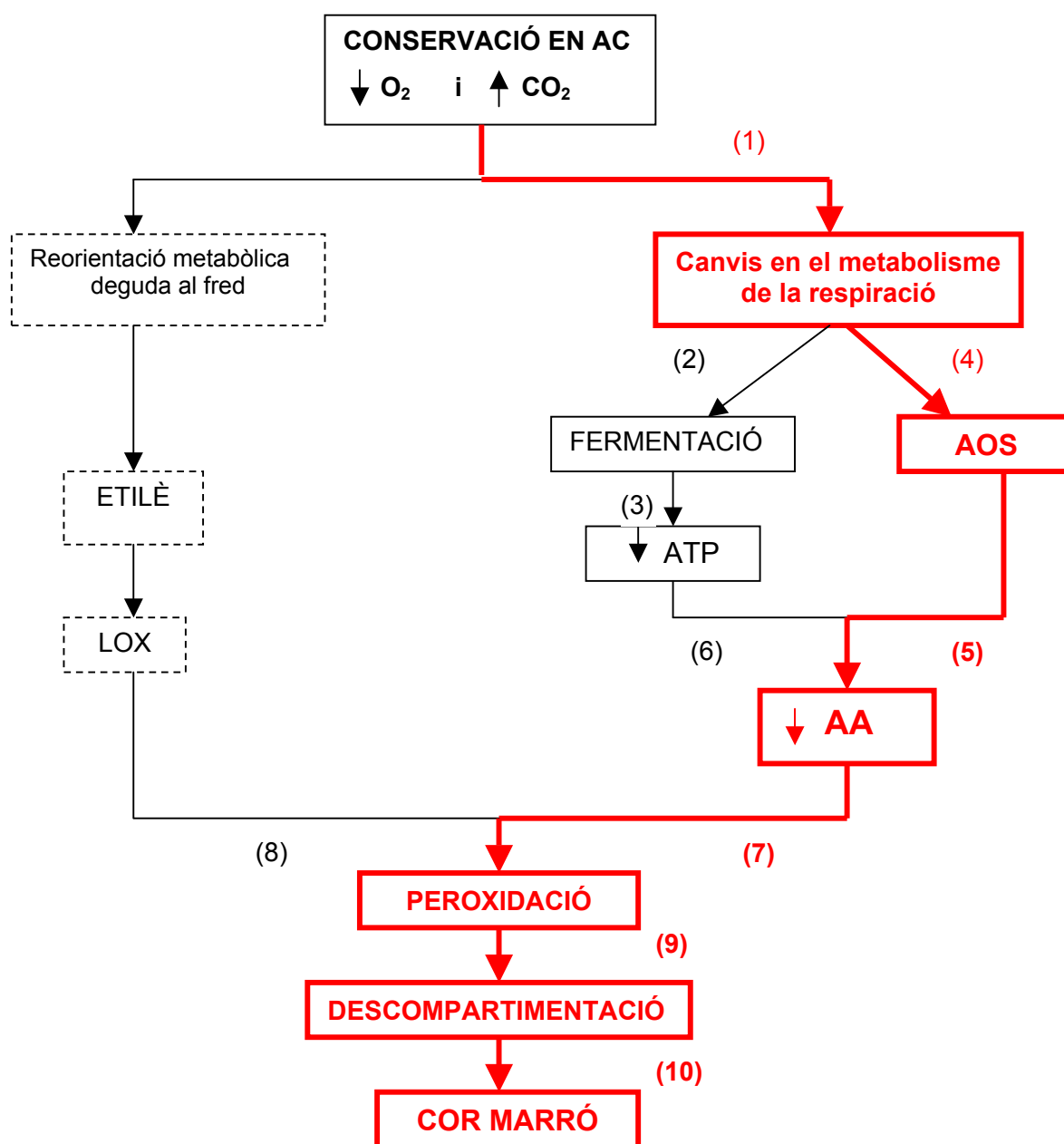
El grau de peroxidació de les membranes dels fruits alterats va ésser significativament superior al que presentaven els fruits sans (Pintó *et al.*, 2001). De la mateixa manera, els fruits afectats de cor marró presentaven una major concentració de MDA + 4HNE (1,53 µM) enfront dels alterats per llocat (1,25 µM). Aquests resultats posen de manifest que el procés de peroxidació és un altre factor important, si no determinant, en la gènesi d'aquestes dues alteracions. Els resultats de Veltman *et al.* (1999b) van dirigits en aquest sentit i alhora confirmen aquesta teoria.

### **3.4.- El paper de la PPO i la descompartimentació**

Veltman *et al.* (1999b) van suggerir que la peroxidació dels lípids de la membrana pot ser la causa del trencament i pèrdua de funcionalitat de les membranes i de la seva posterior descompartimentació. Altres autors, com Eccher Zerbini *et al.* (2002), senyalen també que el cor marró pot ser la conseqüència de la descompartimentació cel·lular i de l'alliberació dels fenols inicialment situats en els vacúols. Així doncs, en una cèl·lula on s'hagin donat processos de descompartimentació, els fenols poden entrar en contacte amb la PPO i es pot iniciar així, la reacció d'enfosquiment enzimàtic. A més, la descompartimentació origina una marcada disminució del pH de la cèl·lula (Nanos i Kader, 1993), fet que afavoreix l'activitat de la PPO (Espin *et al.*, 1997). Però quins són els factors que intervenen en la descompartimentació? Per a donar resposta a aquesta pregunta es presenta en el següent apartat un esquema per a cadascuna de les alteracions.

#### 4.- Esquema explicatiu del cor marró en pera Blanquilla

Després d'analitzar els diferents mecanismes probablement involucrats en el desenvolupament del cor marró, es pot comprovar que cap d'ells de forma aïllada no pot explicar-lo. Més aviat és l'acció conjunta de tots ells la que, en major o menor grau, pot conduir a l'aparició d'aquest desordre fisiològic. A continuació es presenta un esquema general dels diferents factors que poden estar involucrats en l'aparició del cor marró en pera Blanquilla (Figura 4).



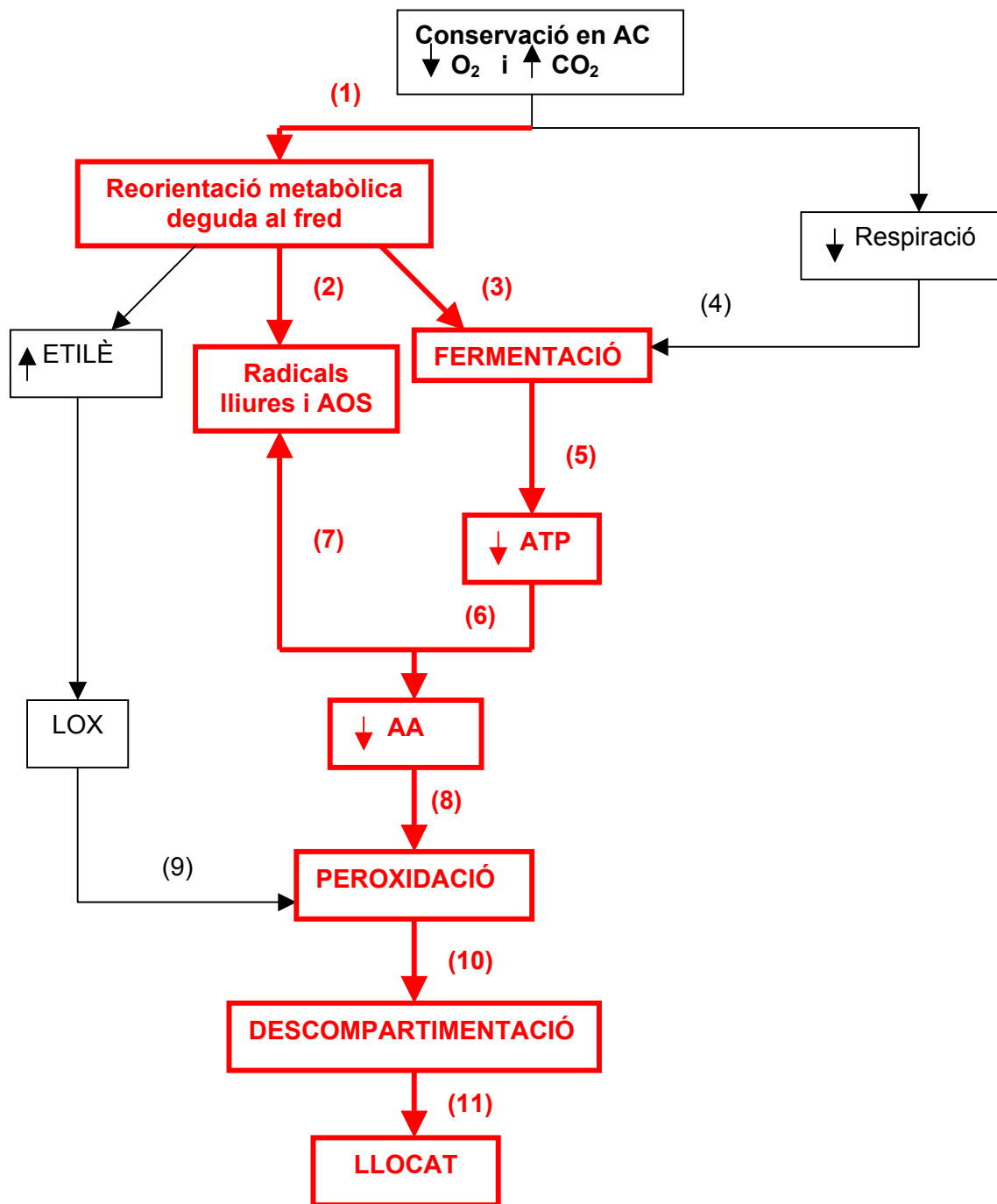
**Figura 4.-** Esquema dels possibles factors involucrats en el cor marró de la pera Blanquilla. La ruta més important s'indica en vermell.

L'AC d'alt CO<sub>2</sub> i baix O<sub>2</sub> condueix a una disminució de la respiració que en alguns casos pot provocar, fins i tot, el deteriorament del mitocondri (1). Aquesta disminució comporta alhora l'activació de la via fermentativa (2), la qual no pot mantenir els nivells de producció d'ATP (3). En els mitocondris alterats, i durant el procés de la respiració, es poden generar AOS i radicals lliures (4). Les AOS condueixen a una oxidació de l'àcid ascòrbic i, per tant, a una disminució important del contingut d'aquest (5). Alhora, la insuficient disponibilitat d'ATP no permet la seva regeneració (6). Aquest baix nivell d'AA fa que el fruit tingui una capacitat antioxidant insuficient i que, per tant, no es puguin continuar metabolitzant les AOS i els radicals lliures. Els radicals lliures i les AOS (7) i l'acció de la LOX (8), induïda sota condicions d'elevat CO<sub>2</sub>, condueixen a la peroxidació dels lípids de les membranes. Conseqüentment, aquesta desintegració i els canvis de permeabilitat de les membranes intracel·lulars condueixen a la descompartimentació cel·lular (9). En aquestes condicions, s'alliberen els fenols en el medi intracel·lular, fet que permet dur a terme la reacció d'enfosquiment enzimàtic per part de la PPO i, com a conseqüència, es desenvoluparà el cor marró (10).

## **5.- Esquema explicatiu del llocat o descomposició interna en pera Blanquilla**

En el llocat, igual que en el cor marró, hi intervenen una sèrie de factors que de forma conjunta ajuden a explicar la incidència d'aquest desordre (Figura 5).

Els fruits conservats en fred i en condicions d'AC d'alt CO<sub>2</sub>, pateixen una sèrie de canvis metabòlics (1), entre els quals cal destacar la generació de radicals lliures i d'AOS (2) i l'activació del metabolisme fermentatiu (3). Aquest metabolisme també és induït per la disminució de la respiració que es dona en aquesta atmosfera (4). Alhora, els canvis en el metabolisme de la respiració també condueixen a la generació de radicals lliures i AOS. En aquestes condicions, els nivells d'ATP disminueixen (5) i són insuficients per a regenerar l'àcid ascòrbic (6), el qual s'ha oxidat per l'acció de les AOS (7). En conseqüència, els radicals lliures i les AOS no poden continuar essent metabolitzats per l'AA (7), amb la qual cosa s'inicia la peroxidació dels lípids de la membrana (8). Simultàniament, es promou l'acció de la LOX, la qual també intervindrà en la peroxidació dels lípids (9). Com a conseqüència de la peroxidació de les membranes tindrà lloc la descompartimentació de les membranes (10). Aquesta descompartimentació permet dur a terme la reacció d'enfosquiment enzimàtic per part de la PPO, la qual conduirà a la incidència del llocat (11).



**Figura 5.-** Esquema dels possibles factors involucrats en el llocat de la pera Blanquilla. La ruta més important s'indica en vermell.

## **6.- Es pot predir el cor marró i el llocat en la pera Blanquilla? Hi ha algun paràmetre que es pugui utilitzar com a indicador d'aquests desordres?**

Per intentar donar resposta a aquesta pregunta s'ha realitzat l'anàlisi PLS (Capítols 3, 4 i 5) i l'anàlisi de classificació (Capítol 6) per a les dues alteracions en funció dels principals paràmetres que hi estan involucrats.

Ni el llocat ni el cor marró no es poden predir a partir de cap dels paràmetres de qualitat estudiats (Capítol 4 i 6). Malgrat tot, una disminució acusada en el contingut d'àcids sembla correlacionar-se amb la incidència de cor marró. En canvi, el llocat sembla relacionar-se amb la manca de fermesa.

Els resultats de l'anàlisi PLS per als paràmetres bioquímics semblen indicar que el llocat es pot predir amb una certa exactitud si es té en compte la totalitat d'aquests paràmetres, essent els més importants l'activitat de l'ADH seguida de l'activitat de la CAT. En canvi, l'anàlisi PLS per al cor marró no dóna tan bons resultats com per al llocat, malgrat que aquests continuen essent força acceptables. Els paràmetres determinants en aquest cas són les activitats de l'APX i de la CAT (Capítol 3).

Un cop estudiats els models de predicció per a aquestes dues alteracions, s'ha intentat utilitzar algun dels paràmetres estudiats com a possible marcador dels desordres i, posteriorment, s'ha comprovat si permetran distingir entre fruits sans i fruits alterats. La caracterització de fruits sans i fruits alterats s'ha dut a terme mitjançant l'anàlisi de classificació (Capítol 6). Els resultats d'aquesta anàlisi són força bons tant per al llocat com per al cor marró quan s'utilitzen models de predicció basats en la totalitat dels paràmetres bioquímics. El problema rau en el fet que aquestes determinacions són dificultoses de dur a terme i, per tant, no es poden utilitzar en una cooperativa per a caracteritzar els fruits. Aquest problema s'agreuja encara més quan no existeix un únic paràmetre que es pugui utilitzar com a marcador sinó que se n'han d'utilitzar un conjunt d'ells. Per al llocat el cas es complica encara més, ja que s'haurien d'utilitzar sis paràmetres, entre els quals no n'hi cap que sembli tenir un grau d'implicació superior als altres. Per al cor marró, l'únic paràmetre que es perfila com un possible marcador és la concentració d'àcid ascòrbic, indicador que ja havien senyalat anteriorment altres autors (Eccher Zerbini *et al.*, 2002; Veltman *et al.*, 1999b). En aquest cas, faltaria trobar primer el nivell d'AA a partir del qual es comença a desenvolupar el desordre i després caldria comprovar si aquest paràmetre és prou eficaç per a dur a terme la caracterització dels fruits alterats de forma pràctica en la cooperativa.



## Referències

- BEN-AIRE, R., LEVIN, A., SONEGO, L., YOHANAN, Z. 1993. Physiological effects of CO<sub>2</sub> in CA-stored apples. *Washington State University tree fruit postharvest journal*, 4(2): 47-48.
- BENDALL, D.S., RANSON, S.L., WALKER, D.A. 1958. Some effects of carbon dioxide-bicarbonate mixtures on the oxidation and reduction of cytochrome c by *Ricinus* mitochondria. *Nature*, 181: 133-134.
- BERTOLINI, P., BOTTARDI, S., ROSA, M.D., FOLCHI, A. 1997. Effect of controlled atmosphere storage on the physiological disorders and quality of Conference pears. *Italian Journal of Food Science*, 4: 303-312.
- BONDOUX, P. 1994. *Enfermedades de conservación de frutos de pepita, manzanas y peras*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- BRACKMANN, A., SAQUET, A.A. 1995. Armazenamento de maçã cv. "Gala" em atmosfera controlada. *Rev. Bras. De Agrociência*, 1: 55-60.
- BRACKMANN, A., MAZARO, S.M., BORTOLUZZI, G. 1995. Qualidade da maçã "Fuji" sob condições de atmosfera controlada. *Ciência Rural*, 25: 215-218.
- BROWN, A.W. 1985. CO<sub>2</sub> and intracellular pH. *Plant Cell Environment*, 8: 427-238.
- BURMEISTER, D., DILLEY, D. 1995. A scald-like controlled storage disorder of Empire apples – A chilling injury induced by CO<sub>2</sub>. *Postharvest Biology and Technology*, 6: 1-7.
- CHEN, M. 2000. Pyruvate decarboxylase is a reliable biochemical marker for forecasting physiological disorders of "Anjou" pears in CA storage. *Proceedings of 4<sup>th</sup> International Conference on Postharvest*. Jerusalem, Abstract, pp. 13.
- CHERVIN, C., BRADY, C.J., PATTERSON, B.D., FARAGHER, J.D. 1996. Could studies on cell responses to low oxygen levels provide improved options for fruit storage and disinfection? *Postharvest Biology and Technology*, 7: 289-299.
- CHERVIN, C., TRUETT, J.K., SPEIRS, J. 1999. Alcohol dehydrogenase expression and alcohol production during pear ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124 (1): 75-79.
- DE LA PLAZA, J.L. 1973. Citat a: De la Plaza, J.L. 1986. Corazón pardo en pera. *Fruticultura profesional*, 6: 9.
- DE LA PLAZA, J.L. 1986. Corazón pardo en pera. *Fruticultura profesional*, 6: 9.
- ECCHER ZERBINI, P., RIZZOLO, A., BRAMBILLA, A., CAMBIAGHI, P. 2002. Loss of ascorbic acid during storage of Conference pears in relation to the appearance of brown heart. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 :1007-1013.
- ESPÍN, J.C., MORALES, M., VARÓN, R., TUDELA, J., GARCÍA-CÁNOVAS, F. 1997. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Blanquilla pear, 44: 17-22.
- FRENKEL, C., PATTERSON, M.E. 1977. Metabolic effects of CO<sub>2</sub> in Barlett pears. In: D.H. Dewey (ed.). *Controlled atmosphere*.
- GONZÁLEZ-MELER, M.A., RIBAS-CARBÓ, M., SIEDOW, J.N., DRAKE, B.G. 1996. Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, 112: 1349-1355.

- GRANT, J., MITCHAM, B., BIASI, B., CHINCHILO, S., 1996. Late harvest, high CO<sub>2</sub> storage increase internal browning of Fuji apples. *California Agriculture*, 50(3): 26-29.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, U.K.
- HERRERO, A. 1982. *Enfermedades y fisiopatías de peras y manzanas en conservación frigorífica*. Ed, Dilagro. Lleida
- HERRERO, A., GUÀRDIA, J. 1992. *Conservación de frutos*. Manual Técnico. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- HULME, AC. 1956. Carbon dioxide injury and the presence of succinic acid in apples. *Nature*, 178: 218-219.
- KADER, A.A. 1986. Biochemical and physiological bases for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology*, 40: 99-104.
- KE, D., MATEOS, M., KADER, A.A. 1993. Regulation of fermentative metabolism in fruits and vegetables by controlled atmospheres. In: G.D. Blaupied, J.A. Bartsh, J.R. Hicks (eds.). *Proceedings 6<sup>th</sup> International Controlled Atmosphere Research Conference 20, Ithaca, USA: pp. 63-77*.
- KE, D., YAHIA, E., MATEOS, M., KADER, A.A. 1994. Ethanol fermentation of "Barlett" pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119: 976-982.
- KERBEL, EL., KADER, A.A., ROMANI, R.J., 1988. Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on glycolysis in intact Barlett pear fruit. *Plant Physiology*, 112: 1349-1355.
- LANGE, D., KADER, A.A. 1997. Elevated carbon dioxide exposure alters intracellular pH and energy charge in avocado fruit tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122: 253-257.
- LARRIGAUDIÈRE, C., PINTÓ, E., LENTHERIC, I., VENDRELL, M. 2001a. Involvement of oxidative processes in the development of core browning in controlled-atmosphere stored pears. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76(2): 157-162.
- LARRIGAUDIÈRE, C., LENTHERIC, I., PINTÓ, E., VENDRELL, M. 2001b. Short-term effects of air and controlled atmosphere storage on antioxidant metabolism in Conference pears. *Journal of Plant Physiology*, 158: 1015-1022.
- LAU, O.L., YASTREMSKI, R., MEHERIUK, M. 1987. Influence of maturity, storage procedure, temperature and oxygen concentration on quality and disorders of "McIntosh" apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 112: 93-99.
- LENTHERIC, I., PINTÓ, E., VENDRELL, M., LARRIGAUDIÈRE, C. 1999. Harvest date affects the antioxidative systems in pear fruits. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74(6): 791-795.
- LIDSTER, P., BLANPIED, G., PRANGE, R. 1990. Controlled-atmosphere disorders of commercial fruits and vegetables. Agr. Can. Publ. 1947/E, *Communications Branch, Agriculture*, Canada, Ottawa.
- LICHTENTALER, H. 1996. An introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148: 4-14.
- MEHERINK, M., LAU, O.L., HALL, J.W. 1984. Effects of some postharvest and storage treatments on the incidence of flesh browning in controlled atmosphere stored "Delicious" apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109: 290-293.

- MELHORN, H., LELANDAIS, M., KORTH, H., FOYER, C. 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett*, 378: 203-206.
- NANOS, G., KADER, A.A. 1993. Low O<sub>2</sub> induced changes in pH and energy charge in pear fruit tissue. *Postharvest Biology and Technology*, 3: 285-291.
- NANOS, G.D., ROMANI, R.J., KADER, A.A. 1992. Metabolic and other responses of "Barlett" pear fruit and suspension-cultured "Passe Crassane" pear fruit cells held in 0,25% O<sub>2</sub>. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117: 934-940.
- NOCTOR, G., FOYER, C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- OTMA, E.C. 2001. Brown heart in Conference pears. *International Controlled Atmosphere Research Conference. Rotterdam, The Netherlands. Abstract code P-02-09*.
- PALAZÓN, I. 1984. *Estudio de los problemas patológicos de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza*. Ed. Diputación Provincial de Zaragoza. Institución Fernando El Católico, Publi. 990.
- PEPPELENBOS, H.W., OÖSTERHAVEN, J. 1998. A theoretical approach on the role of fermentation in harvested plant products. *Acta Horticulturae*, 464: 381-386.
- PESIS, E., LEVI, A., BEN ARIE, R. 1988. Role of acetaldehyde in the removal of astringency from persimmon fruits under various modified atmospheres. *Journal Food Science*, 53: 153-156.
- PIERSON, C.F., CEPONIS, M.J., CULLOCH, L.P. 1971. Market diseases of apples, pears and quince. *U.S. Department Agriculture Handbook*, pp. 376.
- PINTÓ, E., LENTHERIC, I., VENDRELL, M., LARRIGAUDIÈRE, C. 2001. Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 364-370.
- PRASSAD, T., ANDERSON, M., STEWART, C. 1994. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiology*, 105: 619-625.
- RECASENS, I. 2000. Alteraciones fisiológicas de la fruta durante la poscosecha. *Post-recolección de Frutos y Hortalizas. V Simposio Nacional y II Ibérico. Tenerife. pp. 165-174*.
- RICARD, B., COUTÉE, I., RAYMOND, P., SAGLIO, P.H., SAINT-GES, V., PRADET, A., 1994. Plant metabolism under anoxia. *Plant Physiology and Biochemistry*, 32: 1-10.
- ROBERTS, J.K.M., CALLIS, J., JARDETZKY, O., WALBOT, V., FREELING, M., 1984. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proceedings of the Academic of Natural Sciences of USA*, 81: 6029-6033.
- ROELOFS, F., DE JAGER, A. 1997. Reduction on brownheart in Conference pears. *Proceedings 7<sup>th</sup> International Controlled Atmosphere Research Conference, Davis, July 13-18. Apples and pears*, 2: 138-144.
- SAQUET, A., STREID, J., BANGERTH, F. 2000. Changes in ATP, ADP and pyridine nucleotide levels related to the incidence of physiological disorders in "Conference" pears and "Jonagold" apples during controlled atmosphere storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 243-249.

- SIRIPHANICH, J., KADER, A.A. 1986. Change in cytoplasmatic and vacuolar pH in harvested lettuce tissue as influenced by CO<sub>2</sub>. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111: 73-77.
- THOMAS, 1928. Citat en: PEPPELENBOS, H.W., OÖSTERHAVEN, J. 1998. A theoretical approach on the role of fermentation in harvested plant products. *Acta Horticulturae*, 464: 381-386.
- THOMAS, C.E., McLEAN, L.R., PARKER, R.A., OHLWELLER, D.F. 1992. Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids*, 27: 543-549.
- VELTMAN, R., LARRIGAUDIÈRE, C., WICHERS, J., VAN SCHAIK, A., VAN DER PLAS, W., OOSTERHAVEN, J. 1999a. PPO activity and polyphenol content are not limiting factors during brown core development in pears. *Journal of Plant Physiology*, 154: 697-702.
- VELTMAN, R., SANDERS, M.G., PERSIJN, S.T., PEPPELENBOS, H.W., OÖSTERHAVEN, J. 1999b. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. Cv. Conference). *Physiologia Plantarum*, 107: 39-45
- VELTMAN, R., KHO, R.M., VAN SCHAIK, A.C.R., SANDERS, M.G., OOSTERHAVEN, J. 2000. Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. Cvs. Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 129-137.
- VELTMAN, R. 2002. *Doctoral thesis. On the origin of internal browning in pears (Pyrus communis L. cv. Conference)*. Wageningen Universiteit.
- VELTMAN, R., LENTHÉRIC, I., VAN DER PLAS, L.H.W., PEPPELENBOS, H.W. 2002. Internal browning in *Pyrus communis* fruits is caused by a combined effect of oxygen free radicals and a limited energy availability. *Postharvest Biology and Technology*, (en premsa)
- VOLZ, R., BIASI, W., MITCHAM, E. 1998. Fermentative volatile production in relation to carbon dioxide-induced flesh browning in "Fuji" apple. *Hortscience*, 33: 1231-1234.
- WATKINS, C.B., ZHANG, J. 1998. Metabolic responses of fruit to carbon dioxide. *Acta Horticulturae*, 464: 345-350.
- WILLIAMS, MW., PATTERSON, ME. 1964. Non-volatile organic acids and core breakdown of Barlett pears. *Agricultural and Food Chemistry*, 12: 80-83.

---

## V . CONCLUSIONS

---

## CONCLUSIONS

1. La concentració de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera de conservació és el factor fonamental que determina la incidència del cor marró i del llocat en la pera Blanquilla. El cor marró solament apareix en condicions d'alt CO<sub>2</sub>, mentre que el llocat es dona en aquesta atmosfera i en condicions de fred normal.
2. La susceptibilitat al cor marró i al llocat en peres Blanquilla està estretament lligada a l'estat de maduresa del fruit en el moment de la recol·lecció. Fruits provinents de collites primerenques no desenvolupen les alteracions en cap de les atmosferes de conservació. En canvi, els fruits més madurs desenvolupen el cor marró en l'atmosfera de baix CO<sub>2</sub> al final del període de conservació. Aquests també presenten una major incidència de llocat en l'atmosfera de fred normal al final del període de frigoconservació.
3. En l'AC d'alt CO<sub>2</sub>, ambdues fisiopaties es diferencien en el temps en què apareixen. El llocat apareix als tres mesos de conservació mentre que el cor marró es presenta després d'aquest període. En canvi, el llocat en l'atmosfera de fred normal apareix al final del període de conservació.
4. L'increment de l'estat de maduresa a la collita està associat a una disminució del contingut d'antioxidants com l'ascorbat i el glutatió així com a una més baixa activitat dels enzims antioxidants. Aquesta reducció en el sistema de defensa antioxidant pot explicar que els fruits més madurs presentin una major susceptibilitat a patir desordres com el cor marró i el llocat.
5. És difícil establir el mecanisme per al qual alts nivells de CO<sub>2</sub> condueixen a la incidència de cor marró i de llocat. En totes les atmosferes de conservació, durant els primers dies es dona una important disminució del contingut d'AA; aquesta és bastant més acusada en l'AC d'alt CO<sub>2</sub>. A més, en aquesta atmosfera, i a diferència de la de fred normal i de l'AC de baix CO<sub>2</sub>, no es regeneren els nivells d'ascorbat i aquest compost es manté a nivells molt baixos i insuficients. L'AC d'alt CO<sub>2</sub> condueix a una situació d'estrès oxidatiu en la qual els nivells d'AA i dels enzims antioxidants són determinants per a previndre els danys.
6. El cor marró i el llocat són dues alteracions diferents que impliquen rutes metabòliques parcialment similars, però que el grau d'implicació de cada via metabòlica és diferent en funció del desordre de què es tracti.
7. El cor marró és conseqüència dels danys oxidatius que es donen sota condicions d'elevat CO<sub>2</sub>, els quals no es poden previndre a causa de la insuficient capacitat del seu sistema antioxidant. En aquest sistema, té un paper molt important el contingut d'AA i l'activitat dels enzims APX i CAT, els quals no poden metabolitzar totes les AOS i els radicals lliures generats. Paral·lelament, s'indueix el metabolisme fermentatiu, el qual no pot mantenir els nivells d'energia necessaris per a regenerar el contingut d'AA. Com a resultat, es donen els processos de peroxidació i de descompartimentació que conduiran al cor marró.

8. El llocat és conseqüència d'un procés de senescència accelerada que indueix principalment la via fermentativa, amb la conseqüent acumulació de metabòlits tòxics com l'acetaldehid i disminució de la producció d'ATP. Els nivells d'AA també disminueixen, però de forma menys determinant que en el cas del cor marró, de manera que el contingut d'AA no pot fer front a les AOS i als radicals lliures que s'han generat. Simultàniament, aquest procés oxidatiu amb altres processos com l'activació de la LOX condueixen a la peroxidació de les membranes i finalment a la descompartimentació i al llocat.
9. L'anàlisi multivariant confirma els resultats obtinguts amb l'anàlisi bioquímica i també posa de manifest que el cor marró i el llocat són dues alteracions diferents que apareixen en temps diferenciats i impliquen vies metabòliques similars amb diferent grau d'implicació.
10. Els models de predicció construïts a partir dels paràmetres de qualitat no són prou bons per a predir cap de les dues alteracions estudiades. Com s'ha comprovat en l'anàlisi de classificació, cap d'aquests paràmetres pot utilitzar-se com a marcador per a predir o detectar les fisiopaties.
11. Els models de predicció construïts a partir de la totalitat dels paràmetres bioquímics per a cadascuna de les alteracions són vàlids per a caracteritzar les mostres. En el cor marró, el paràmetre més important és l'àcid ascòrbic seguit de l'activitat de l'APX i la CAT. En canvi, en el llocat el més important és l'activitat de l'ADH seguida de l'activitat dels restants amb importància similar.