



**EL EFECTO DE LAS ATMÓSFERAS RICAS EN CO<sub>2</sub>  
EN LOS PATRONES DE ACUMULACIÓN DE ETANOL, pH, ACIDEZ  
TITULABLE, SÓLIDOS SOLUBLES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN  
DIVERSOS PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas**

**P R E S E N T A**

**MARÍA DE LOURDES YÁÑEZ LÓPEZ**

**Septiembre 2007**

**“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT (la sustentante NO recibió apoyo del mismo Consejo) con el convenio PFP-20-93”**

**El jurado designado por las  
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó**

**MARÍA DE LOURDES YÁÑEZ LÓPEZ**

**El día 26 de septiembre del 2007**

**Comité Tutorial:**

**Director: Dr. Efraín Mercado Pichardo**\_\_\_\_\_

**Codirector: Dr. Elhadi Yahia Kazuz**\_\_\_\_\_

**Asesor: Dr. Miguel A. Armella Villalpando**\_\_\_\_\_

**Sinodal: Dra. Ma. de Lourdes A. Escamilla Hurtado**\_\_\_\_\_

**Sinodal: Dra. Teresa Reyna Trujillo** \_\_\_\_\_

**Sinodal: Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano** \_\_\_\_\_

**Representante del Comité de Doctorado en Ciencias Biológicas:**

**Dr. J. Alejandro Zavala Hurtado** \_\_\_\_\_

Dedico esta tesis a:

Mi esposo, Dr. Miguel Ángel Armella V. quien siempre me ha brindado todo su apoyo incondicional y los mejores consejos académicos y morales, para lograr mi realización tanto como mujer como profesionista, con todo mi amor y agradecimiento.

Mis padres, Dres. José Luis Yáñez E.<sup>+</sup> y María de Lourdes L. de Yáñez<sup>+</sup> por su cariño, apoyo y guía en mi vida y desarrollo profesional.

Al Dr. Efraín Mercado por su paciencia en la conducción y por su inagotable apoyo y amistad sincera durante toda la realización de esta tesis.

Al Dr. Elhadi Yahia K. por su invaluable amistad, consejos y guía en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Teresa Reyna Trujillo por su invaluable apoyo y amistad en todo momento, tanto académica como moralmente.

A todos mis asesores y sinodales por su paciencia y apoyo, así como por los mejores consejos y guía durante toda la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Alberto Castillo y Susi por su paciencia y atinados consejos en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Gustavo Fuentes Zurita por todo el apoyo y asesoría en las determinaciones físicas de las condiciones experimentales.

La M. en C. Lourdes Martínez Cárdenas por su valiosa asesoría en las técnicas de separación de protoplastos de células vegetales.

Dr. Eduardo Casas por su valioso apoyo y guía en la utilización del microscopio.

Al Dr. Ramón Verde C. por su invaluable asesoría en el análisis de muestras por HPLC.

La M. en C. María del Carmen Fajardo por su atinada asesoría y apoyo en la utilización y técnicas de extracción de muestras para análisis en el HPLC.

Al Dr. Jorge Gómez H. por su muy valioso apoyo para la terminación de la fase experimental respecto al préstamo de equipo y asesoría, así como por el tiempo concedido para la escritura de la tesis.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por su invaluable apoyo para la adquisición de material para la elaboración de la parte experimental de la tesis.

La Dra. Clara Pelayo Z. por su valioso apoyo en la revisión de la introducción y antecedentes de la tesis.

La Dra. Ma. de Lourdes Escamilla Hurtado por sus invaluable consejos en la revisión de la versión final de la tesis.

La Dra. Gabriela Rodríguez Serrano por sus apreciables observaciones en la revisión final de la tesis.

Al Dr. José Alejandro Zavala por todo el apoyo brindado en la revisión de la tesis.

A la Dra. Reyna Fierro Pastrana por su infinito apoyo en los trámites para la obtención del grado de doctorado.

Mis amigos y amigas por todo su apoyo moral y espiritual, sobre todo en los momentos más difíciles tanto en mi vida privada como en mi vida profesional.

## RESUMEN

Las atmósferas controladas (AC) consisten en proporcionar a los productos hortofrutícolas una mezcla específica y precisamente controlada de gases en su ambiente de almacenamiento, el cual difiere de la composición de aire de la atmósfera normal. Las atmósferas modificadas difieren de las primeras en que el ambiente de almacenamiento no puede controlarse con precisión. Algunos productos se ven afectados adversamente por las elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, lo cual ocasiona la evasión del uso de dichas atmósferas. El presente estudio se enfocó en la observación de los efectos de las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> principalmente sobre la acumulación de etanol (ETOH) de 20 diferentes frutas: ciruela (*Prunus domestica*, L.), durazno (*Prunus persica*, L.), fresa (*Fragaria X annanasa*, Duch.), kiwi (*Actinidia deliciosa*, Planch.), limón (*Citrus limon*, Burm. F.), manzana (*Malus pumila* Mill), naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* (Haw.) F. Buxb.), plátano tabasco (*Musa paradisiaca*, L.), toronja (*Citrus X paradisi*, Macf.), tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill), uva (*Vitis vinifera*, L.), y hortalizas: brócoli (*Brassica oleracea*, L. grupo Italica), col (*Brassica oleracea*, L. grupo Capitata), betabel (*Beta vulgaris*, L.), jitomate (*Lycopersicon esculentum*, L.), lechuga (*Lettuca sativa*, L.), papa (*Solanum tuberosum*, L.), pepino (*Cucumis sativus*, L.), y zanahoria (*Daucus carota*, L.), durante una corta exposición a una mezcla de aire y 30% (v/v) de CO<sub>2</sub>. También fueron evaluados otros parámetros químicos de calidad como: sólidos solubles totales, pH, acidez total titulable, y ácidos orgánicos (cítrico, málico, pirúvico y succínico).

La metodología para la determinación de ETOH fue la cromatografía de gases, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para el análisis de ácidos orgánicos y refractometría para los sólidos solubles totales así como pH y acidez titulable por potenciometría.

El efecto de la temperatura de almacenamiento en atmósferas con altos niveles de CO<sub>2</sub> afectó únicamente a la concentración de ETOH, pero no al patrón de acumulación del mismo en aquellos productos en los que se realizaron experimentos de doble control. Con esto se logró diferenciar si la acumulación de ETOH se debía efectivamente a su exposición a altos niveles de CO<sub>2</sub>, o al daño por frío provocado por bajas temperaturas de almacenamiento.

Los sólidos solubles totales tendieron a la disminución en la mayoría de los productos hortofrutícolas estudiados.

El pH tendió a incrementarse en la mayoría de los productos estudiados sin alcanzar la alcalinidad, contrario a la disminución de la acidez titulable. El ETOH resultó estar altamente correlacionado positivamente con el pH en la papa y la lechuga, y negativamente con la acidez titulable.

Se concluye que las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> producen efectos iguales a los de la anaerobiosis en los productos hortofrutícolas respecto a la acumulación de ETOH en los mismos.

Se obtuvieron diversas magnitudes de respuesta de los 20 productos hortofrutícolas estudiados expuestos a los altos niveles de CO<sub>2</sub> con respecto a la acumulación de ETOH. Se observaron cinco grupos de patrones principales de acumulación de ETOH en los productos hortofrutícolas en respuesta a su almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>: lineal constante; cuadrático positivo

o cuadrático negativo constantes; y los que cambiaron su patrón de acumulación de ETOH de lineal a cuadrático positivo; lineal a cuadrático negativo y cuadrático positivo a cuadrático negativo, siendo éste último el que se sugiere como menos recomendable debido a la alta acumulación de ETOH al principio del período de almacenamiento aunque hacia el final del mismo ocurre la metabolización o exudación del mismo. Respecto a los niveles iniciales de acumulación de ETOH el kiwi y el brócoli, aunque pertenecientes a diferentes grupos, poseían niveles iniciales bajos de ETOH, los cuales se incrementaron inmediatamente después del primer día de almacenamiento. Los plátanos y los cítricos (no todos del mismo grupo) presentaban altas concentraciones de ETOH al principio del período de almacenamiento, los cuales se incrementaron aún más durante dicho período. El pepino y la lechuga orejona (sin pertenecer al mismo grupo) mantuvieron aproximadamente un aumento constante en su acumulación de ETOH durante todo el período de almacenamiento. Algunos cítricos, la tuna cardona, el plátano tabasco y el betabel (pertenecientes a diferentes grupos) presentaron una disminución inesperada en su contenido de ETOH ya sea después del primero o segundo días de almacenamiento.

Los resultados de los análisis organolépticos de aquellos productos con buena apariencia después de haber sido tratados con altos niveles de CO<sub>2</sub> fueron positivos, ya que el aroma residual del CO<sub>2</sub> se eliminaba después de unos minutos de haber sido expuestos una vez más al aire.

## ABSTRACT

Controlled atmospheres (CA) consist of providing commodities with a specified and precisely controlled mixture of gases in the storage atmosphere which is different from the normal air atmosphere. Modified atmospheres (MA) are different from the latter in the inability to control with precision their composition. Some commodities are adversely affected by elevated CO<sub>2</sub> atmospheres preventing its commercial use. The present study was focused on CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres and their effects on 20 different fruits: apple (*Malus pumila*, Mill.), banana (*Musa paradisiaca*, L.), grape (*Vitis vinifera*, L.), grapefruit (*Citrus X paradise*, Macf.), kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*, Planch.), lime (*Citrus limon*, Burm. F.), orange (*Citrus sinensis*, (L.) Osbeck), peach (*Prunus persica*, L.), pitaya de mayo (*Stenocereus griseus*, (Haw.) F. Buxb.), plum (*Prunus domestica*, L.), prickly pear (*Opuntia ficus indica*, (L.) Mill.), strawberry (*Fragaria X annanasa*, Duch.), and vegetables: beet (*Beta vulgaris*, L.), broccoli (*Brassica oleraceae*, L. Italica group), cabbage (*Brassica oleraceae*, L. Capitata group), carrot (*Daucus carota*, L.), cucumber (*Cucumis sativus*, L.), lettuce (*Letuca sativa*, L.), potato (*Solanum tuberosum*, L.), and tomato (*Lycopersicon sculentum*, L.), mainly on ethanol (ETOH) accumulation, during short-term exposure to an air-30% (v/v) CO<sub>2</sub> mixture storage atmosphere. Changes in total soluble solids (TSS), pH, total titratable acidity (TTA), and organic acids (citric, malic, pyruvic, succinic) were also evaluated.

Methodology used included gas chromatography for ETOH measurements and HPLC analysis for organic acids. Refractometry was used for TSS and potentiometry was used to evaluate both, pH and TTA.

Of the 20 different horticultural products studied, different magnitudes of response to high levels of CO<sub>2</sub> and air were observed with respect to ETOH accumulation. Five ETOH accumulation patterns were found: constantly linear; constantly quadratic positive or quadratic negative; and those patterns which changed from: linear to quadratic positive, linear to quadratic negative and quadratic positive to quadratic negative, being the produce which presented the latter the ones recommended as the least ideal for CO<sub>2</sub> storage due to their high levels of ETOH during the first hours of storage although they metabolize or exudate it later in the storage period. With respect to the initial ETOH levels kiwi and broccoli, in spite of belonging to different groups had low ETOH levels which increased immediately after the first day of storage. Bananas and some citrus (not all of them within the same group) showed high levels of CO<sub>2</sub> at the beginning of the storage period which increased even more during it. Cucumber and leaf lettuce (from different groups) held an approximate constant increase in ETOH accumulation during all the storage period. Some citrus fruits, prickly pear, banana and beet (from different groups) showed an unexpected decrease in their ETOH levels either in their first or their second day of storage.

Storage temperature in high levels of CO<sub>2</sub> (30% v/v) atmosphere treatment affected only ETOH concentration but no effect was seen on ETOH accumulation pattern in those chilling injury sensitive commodities in which double control experiments were made, due to the necessity of verifying whether the

ETOH accumulation was due to their exposure to high levels of CO<sub>2</sub> or to the effects of low storage temperatures.

TSS tended to decrease in most of the studied commodities.

pH increased in most of the studied produce without getting to alkalinity, due to the decrease in TTA.

It is concluded that enriched CO<sub>2</sub> (30%-air v/v) atmospheres have anaerobic effects on horticultural produce with respect to ETOH accumulation.

Sensory analysis results in those produce with a good appearance after being treated with CO<sub>2</sub> were positive in view that residual aroma was acceptable after a few minutes of exposure back to normal air atmosphere.

## ÍNDICE

Miembros del jurado.....	3
Dedicatoria y agradecimientos .....	4
Resumen.....	6
Abstract.....	9
Índice.....	12
1.Introducción,.....	15
2.Hipótesis de trabajo, objetivos.....	50
Metas.....	52
3. Materiales y métodos .....	53
4. Resultados: Patrones de acumulación de etanol en diferentes productos hortofrutícolas en respuesta a su almacenamiento en una atmósfera rica en CO <sub>2</sub> , pH, acidez titulable y sólidos solubles totales, análisis organoléptico en diferentes productos hortofrutícolas en respuesta a su almacenamiento en una atmósfera rica en CO <sub>2</sub> .....	77
5. Discusión ..	99
6. Conclusiones .....	112
7. Literatura citada .	117
8. Apéndice I .....	141
Apéndice II.....	149

## Índice de Figuras:

Fig. 1. Estructura simétrica lineal del CO <sub>2</sub> .....	22
Fig. 2. Estructura de resonancia del CO <sub>2</sub> .....	25
Fig. 3. Estructura del ión carbamato.....	25
Fig. 4. Complejo TPP-acetaldehído.....	29
Fig. 5. Reacciones del proceso de fermentación etanólica.....	30
Fig. 6. Acción de pirofosfato de tiamina (TPP).....	31
Fig. 7. Modelos generales de acumulación de ETOH.....	47
Fig. 8. Cromatógrafo de gases.....	56
Fig. 9. Detector de ionización de la flama.....	57
Fig. 10. Fotodetector de arreglo de diódos.....	70
Fig. 11. Grupo 1. Productos en los que no se presentó diferencia en la acumulación de ETOH durante su almacenamiento en CO <sub>2</sub> . Acumulación de ETOH en forma lineal.....	77-78
Fig. 12. Grupo 2. Especies en las que no se presentó efecto del CO <sub>2</sub> cuyo patrón de acumulación de ETOH fue en forma curva.....	79-80
Fig. 13. Grupo 3. Especies en la que sí se presentó modificación en la forma de acumulación de ETOH. Cambio de patrón lineal en aire a curvilíneo positivo en almacenamiento en CO <sub>2</sub> .....	81-83
Fig. 14. Grupo 4. Especies en las que sí se presentó diferencia en el patrón de acumulación de ETOH entre las dos condiciones de almacenamiento. Patrón lineal en aire y patrón curvilíneo negativo en almacenamiento en CO <sub>2</sub> .....	84-85
Fig. 15. Grupo 5. Especies en las que sí se presentó diferencia en el patrón de acumulación de ETOH entre las dos condiciones de almacenamiento.....	86
Fig. 16. Tendencias en la acumulación de ETOH en productos voluminosos. Correlación por peso.....	91
Fig. 17. Tendencias en la acumulación de ETOH en productos voluminosos. Correlación por volumen.....	92
Fig. 18. Ejemplo de cromatograma de ácidos orgánicos por HPLC.....	98

## Índice de Tablas

Tabla 1. Estándares utilizados para la medición de algunos ácidos orgánicos que participan en el Ciclo de Krebs.....	66
Tabla 2. Tendencias de acumulación de ETOH de diversos productos hortofrutícolas.....	87-88
Tabla 3. Valores propios (eigenvalores) para cada componente principal de cada una de las variables físicas.....	90
Tabla 4. Parámetros químicos de calidad de 13 productos hortofrutícolas bajo estudio.....	95-96
Tabla 5. Promedio de la cantidad total de los diferentes ácidos orgánicos (en $\mu$ moles/L) en pepino almacenado en 2 tipos de atmósfera.....	97
Tabla 6. Promedio de la cantidad total de los diferentes ácidos orgánicos (en $\mu$ moles/L) en kiwi almacenado en 2 tipos de atmósfera.....	97

## 1. INTRODUCCIÓN

Según Kays (1991) el registro más primitivo que versa sobre el almacenamiento en atmósferas modificadas data de la era romana. Owens tradujo, en el año de 1800 D.C., la obra de Terentius Varro (*The Three Books of M. Torentina Varro Concerning Agriculture*), en donde se describió detalladamente, en la época romana, la construcción de pozos subterráneos para el almacenamiento de granos y de cómo sellarlos una vez que se llenaban. Incluso se dieron instrucciones preventivas para no tener acceso a ellos inmediatamente después de abrirlos pues las consecuencias de la inhalación de los gases que los componían eran catastróficas para la salud. De esta manera, los romanos diseñaron una técnica para detectar el aire “viciado” bajando una lámpara de flama al silo (Kays, 1991). Este hecho se basa en que la temperatura de la tierra a una profundidad aproximada a los 2 m se mantiene más o menos constante todo el año y es parecida a la temperatura ambiente promedio de un lugar (Liu, 1992). Sharples (1989), estableció que el uso, con bases científicas, de las atmósferas controladas (AC) y modificadas (AM) fue reportado por primera vez por Franklin Kidd y Cyril West en 1918 y se extendió ampliamente en forma comercial desde los años cuarenta en los Estados Unidos (Kidd y West, 1927; Hardenburg *et al.*, 1986). En la actualidad se usan durante el transporte, el empaque y el almacenamiento de ciertos productos hortofrutícolas (Harvey *et al.*, 1965; Thompson, 1998). De acuerdo con Hardenburg *et al.* (1986) la atmósfera controlada (AC) es una técnica utilizada para mantener la calidad de los productos

en una atmósfera que difiere del aire con respecto a la proporción de oxígeno, dióxido de carbono, o nitrógeno. El término atmósfera modificada (AM) se refiere al empaquetado y transporte de los productos en una atmósfera cuya composición es diferente de la del aire pero que no es controlada con precisión (Liu, 1992). Los principales gases de interés comercial son el oxígeno (O<sub>2</sub>), el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el nitrógeno (N<sub>2</sub>) (Ryall y Lipton, 1979). Ocasionalmente se usan otros gases tales como monóxido de carbono; etileno para madurar frutos en la bodega (Liu, 1992); o etanol (ETOH) y vapores de aldehídos, todos ellos utilizados para diversos propósitos tales como: la prevención del deterioro por crecimiento microbiano (*i.e.* la inhibición de ciertos microorganismos putrefactores) (Harrison y Harvey, 1973; Ryall y Pentzer, 1979; El-Goorani y Sommer, 1981; Kanellis y Solomos, 1985; Sommer 1985; Ke *et al.*, 1991a; Tonini, *et al.*, 1993; Youssef y Mitcham, 1997; Ahmadi *et al.*, 1999; Guevara *et al.*, 2001; Piña-Dumoulin, *et al.*, 2001; Rattanapanone, *et al.*, 2001; Haffner, *et al.*, 2002; Lichter, *et al.*, 2002; Bertolini *et al.*, 2003). Se ha reportado que las AC retardan la senescencia de los productos hortofrutícolas (Kader *et al.*, 1989); disminuyen la incidencia del daño por frío (Hardenburg *et al.*, 1986; Yahia, 1998); controlan las poblaciones de insectos en productos hortofrutícolas (Wang, 1977; Ke *et al.*, 1990; Yahia *et al.*, 1992; Yahia y Hernández. 1993; Yahia y Carrillo-López, 1993; Yahia, 1998; Grove, *et al.*, 2000; Ortega-Zaleta y Yahia, 2000; Alonso *et al.*, 2005); previenen infestaciones por ratas e insectos en bodegas de frutas y hortalizas (Ryall y Pentzer, 1979; Yahia y Hernández, 1993; Yahia y Ortega-Zaleta, 2000); retrasan la maduración de ciertos frutos (Mencarelli y Savarese, 1991); promueven la desastringencia de algunos productos (Pesis y Ben-Arie, 1984); e inhiben ciertos

desórdenes fisiológicos (Tonini, *et al.*, 1993). Se han llevado a cabo diversas revisiones bibliográficas enfocadas a conceptos sobre AC y AM (Harvey, 1977; Hatton y Cubbedge, 1977; Kader y Morris, 1977; Spalding, 1977; Weichmann, 1977a,b; Smock, 1979; Isenberg, 1979; Kader, 1985; Weichmann, 1986; Zagory y Kader, 1988; Liu, 1992; Yahia, 1997; Yahia, 1998). Todas ellas han señalado los efectos benéficos y dañinos de estas atmósferas artificiales. El almacenamiento de los productos hortofrutícolas en atmósferas controladas todavía se limita a su aplicación principalmente en manzanas, peras, aguacates (en Zamora, Michoacán, en donde se utiliza el término “engasar” para referirse a esta técnica) y kiwis; sin embargo, existen muchos estudios sobre el potencial de dichas atmósferas para almacenar un número creciente de frutas y vegetales. Los beneficios técnicos del almacenamiento de los productos hortofrutícolas en atmósferas controladas se han demostrado grandemente en un amplio rango de flores también. Sin embargo, las implicaciones económicas en el uso de esta tecnología, comparativamente más cara, ha limitado su aplicación comercial. No obstante, con los desarrollos tecnológicos de la actualidad, el equipo de control más preciso y los estudios de reducción de costos están facilitando el uso comercial del almacenamiento en AM y AC para un número creciente de productos hortofrutícolas, especialmente para su empaque y transportación (Thompson, 1998; Bender, y Brecht 2000; Ding, *et al.*, 2002).

La concentración interna de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, y etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) en el tejido vegetal determina las respuestas fisiológicas y bioquímicas de ese tejido a una atmósfera de almacenamiento particular. Según Kader *et al.* (1989), las concentraciones

internas están determinadas por la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  y  $\text{C}_2\text{H}_4$ , así como la permeabilidad de las barreras naturales del tejido vegetal (cutícula, epidermis, estomas, lenticelas, etc.), barreras sintéticas como las ceras; la diferencia en la presión parcial de los gases adentro y afuera del tejido entre otros factores (Yahia, 1992).

#### i) ATMÓSFERAS RICAS EN $\text{CO}_2$

Las atmósferas ricas en  $\text{CO}_2$  son aquellos ambientes que contienen niveles de  $\text{CO}_2$  mucho mayores que los presentes en el aire (0.03%). Una atmósfera rica en  $\text{CO}_2$  puede ser generada en forma activa o pasiva (Smith, 1963; Lugg, 1977). Algunos de los efectos que estas atmósferas tienen sobre los productos hortofrutícolas son: la disminución en las reacciones sintéticas de los frutos climatéricos, retardo del inicio de la maduración, inhibición de algunas reacciones enzimáticas, disminución en la producción de algunos volátiles orgánicos, modificación del metabolismo de algunos ácidos orgánicos, reducción de la velocidad de la ruptura de cadenas de sustancias pécticas, inhibición de la ruptura de la estructura de la clorofila, retraso del crecimiento de hongos, inhibición del efecto del etileno, aparentemente por competencia de este compuesto con sus receptores debido a la semejanza en estructura molecular del etileno y el  $\text{CO}_2$ . Las AM y AC reducen la sensibilidad del producto vegetal al etileno (Yahia, 1992); cambios en el contenido de azúcares en productos como la papa y el camote, así como un retraso en la germinación de la misma, inhibición del desarrollo postcosecha, retención de la textura así como una disminución en

los niveles de decoloración en los productos hortofrutícolas (Thompson, 1998; Tian, 2002). Las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> reducen la velocidad de respiración de los productos hortofrutícolas cosechados por un mecanismo de retroalimentación, es decir, la acumulación de CO<sub>2</sub> en la atmósfera ocasiona una disminución en la actividad respiratoria estableciéndose un proceso de retroalimentación en el cual, al saturarse la atmósfera de CO<sub>2</sub> se reduce la respiración. La elevación de la concentración de CO<sub>2</sub> en muchos tejidos vegetales en postcosecha bloquea el movimiento del progreso de la ruta respiratoria, resultando en la disminución neta y frecuentemente importante de la respiración. Este efecto del CO<sub>2</sub>, aunque no es universal, ha sido demostrado en plántulas, plantas intactas, órganos vegetales cosechados y se ha encontrado tanto en condiciones aerobias como en las anaerobias. El grado al cual la respiración es bloqueada aumenta en relación con la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera. Por ejemplo, en las semillas del chícharo (*Pisum sativum*, L.) se mostró que la acción inhibitoria del CO<sub>2</sub> a concentraciones de hasta el 50% aumentó aproximadamente con la raíz cuadrada de la concentración (Wager, 1974a). Por tanto, aparentemente el CO<sub>2</sub> parece retrasar el proceso respiratorio pero no lo bloquea totalmente.

En condiciones aerobias el efecto de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> está estrechamente unido al nivel de reservas energéticas respiratorias dentro del tejido vegetal. La respiración es bloqueada por las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> cuando están presentes las suficientes reservas energéticas respiratorias, una condición muy común en la mayoría de los productos vegetales en postcosecha. Sin embargo, bajo las condiciones en las que se le priva al tejido vegetal de una

fuerza inmediata de carbono almacenado para los procesos respiratorios, la respiración ya no disminuye por efecto de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub>.

El mecanismo de acción preciso de la disminución de la respiración no ha sido explorado adecuadamente. Se sabe que el efecto inhibitorio no se debe a un daño permanente al tejido vegetal, ya que éste se recupera tan pronto como es expuesto a las condiciones atmosféricas normales. Bajo condiciones aerobias se ha demostrado que el CO<sub>2</sub> afecta al ciclo de los ácidos tricarbónicos en la manzana en dos puntos: la conversión del succinato en malato y el malato en piruvato. La enzima succinato deshidrogenasa parece ser la enzima más afectada. El otro punto es el efecto tóxico de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> resultando en altas concentraciones de succinato acumuladas en los tejidos de la manzana, las cuales causan daño a los mismos (Kays, 1991).

A concentraciones de 20% o más (dependiendo del cultivar, la concentración de oxígeno y la duración de la exposición) pueden ocasionar la acumulación de ETOH y de ACET dentro de los tejidos (Smagula y Bramlage, 1977a,b; Kader, 1986; Thompson, 1998; Petracek, *et al.*, 2002). También son afectados, ya sea positiva o negativamente, los cambios en la composición de los productos por las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, e.g., la retención del color, la firmeza (Anderson y Hardenburg, 1977; Buescher y Henederson, 1977), o el sabor y el valor nutritivo (Hatton y Cubbedge, 1977; Weichmann, 1986; Pelayo *et al.*, 2003).

Las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> pueden aliviar, agravar, o inducir algunos desórdenes fisiológicos en frutos y vegetales frescos (Brecht *et al.*, 1973b;

Isenberg, 1979; Wallick y Zinnen, 1990; Lee *et al.*, 1990; Nanos y Mitchell, 1991; Thompson, 1998; Kupferman, 2001; Argenta, *et al.*, 2002). Con el objeto de explicar estas respuestas, Mitz (1979) reportó que ciertas presiones parciales mínimas específicas del CO<sub>2</sub> son requeridas para inducir actividades específicas, lo cual representa una mínima concentración o umbral para causar una reacción. También existen factores intrínsecos en los productos hortofrutícolas que afectan su tolerancia al almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, tales como: época de cosecha (Browne *et al.*, 1984), estados de desarrollo del producto (Kubo *et al.*, 1989; Kubo *et al.*, 1990), especie y cultivar (Lau, 1985; Wollin *et al.*, 1985; Kupferman, 2001; Rattanapanone, 2001; Haffner, *et al.*, 2002), tipo de producto, temperatura de almacenamiento, tiempo de exposición a dicha atmósfera, y concentración de CO<sub>2</sub> (Ke *et al.*, 1990; Rattanapanone, *et al.*, 2001).

La importancia del estudio de los efectos de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en el almacenamiento de los productos hortofrutícolas cosechados es que éste es un producto de la respiración que puede disminuir la velocidad de sus procesos fisiológicos a medida que los niveles de CO<sub>2</sub> aumentan en la atmósfera de almacenamiento (Kubo *et al.*, 1990). Se hace esta aclaración debido a que se ha observado que el CO<sub>2</sub> no ocasiona la disminución de la velocidad de los procesos fisiológicos en las plantas bajo cultivo (órganos vegetales unidos a la planta) (González –Meler, *et al.*, 2004). Además, el CO<sub>2</sub> no deja ningún residuo tóxico en los productos almacenados. Sin embargo, es importante considerar algunos factores que podrían conducir a la emanación de aromas desagradables debidos a los procesos fermentativos, o el desarrollo de desórdenes fisiológicos cuando los productos no son almacenados apropiadamente en este tipo de

atmósferas enriquecidas con CO<sub>2</sub> (Lipton, 1977; Argenta, *et al.*, 2002; Petracek, *et al.*, 2002). Algunos estudios se han enfocado en los efectos de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> sobre la respiración y la producción de etileno (Kerbel, 1990; Kubo *et al.*, 1990; Pal y Buescher, 1993); sobre los cambios en ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares (Singh *et al.*, 1970; Pelayo, *et al.*, 2003); daños y calidad comercial de lechuga (Stewart y Uota, 1971); y sobre el metabolismo de los compuestos fenólicos (Siriphanich y Kader, 1985).

## PROPIEDADES DEL CO<sub>2</sub>

La exposición de los productos hortofrutícolas a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en el ambiente ocasiona diversos tipos de reacciones. Al CO<sub>2</sub> se le conoce también como: anhídrido carbónico, gas ácido carbónico o hielo seco. Mitz (1979) describió las principales propiedades del CO<sub>2</sub> como sigue: el CO<sub>2</sub> tiene una estructura simétrica lineal (Fig. 1), de ahí que tenga un momento dipolo de cero y se podría considerar como una sustancia no polar, de alta estabilidad.

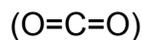


Fig.1. Estructura simétrica lineal del CO<sub>2</sub>

Su peso molecular es de 19.56 g/mol (44.01 lb/mol), su volumen específico es de 0.42 m<sup>3</sup>/2.2 kg (0.19 m<sup>3</sup>/kg) (8.74 ft<sup>3</sup>/lb), su calor específico es de 3.92 BTU/2.2 Kgmol-°C (1.78 BTU/Kgmol-°C) (3.92 BTU/lb mol-°F) a 21.1°C, su gravedad

específica es de 1.555 a 21°C, la densidad del gas es de 0.052 g/28.317dm<sup>3</sup> (0.00184 g/dm<sup>3</sup>) (0.1144 lb/ft<sup>3</sup>) a 21.1°C, 468 Kg/m<sup>3</sup>, y 14.7 psia, P<sub>sat</sub> a 21.1°C es de 852.8 psia; la densidad del líquido es de 21.65 g/28.317dm<sup>3</sup> (0.76 g/dm<sup>3</sup>) (47.64 lb/ft<sup>3</sup>), su punto de ebullición es de -79°C, el punto crítico es de 31.05°C a presión de 1070.6 psia, triple punto: 21.05°C a una presión de 75.13 psia. Es un gas no inflamable, incoloro, de sabor y aroma, en grandes concentraciones, agudamente ácidos, se encuentra en la atmósfera en concentraciones de 0.03% (370.3 ± 10<sup>7</sup> ppm ó µL/L); puede existir simultáneamente como líquido y gas a una temperatura de -56.6°C y a una presión de 60.4 KPa.; su constante de solubilidad de Henry es: 298.15 mol/Kg ± bar; su solubilidad en agua es de 0.9 vol/vol a 20°C. A una temperatura de -79°C y a presión atmosférica el CO<sub>2</sub> se expande, formando el famoso "hielo seco" a una densidad de 44.27 g/28.32 dm<sup>3</sup> (1.56 g/dm<sup>3</sup>) (97.4 lb/pie<sup>3</sup>), compactándose el sólido resultante en una prensa de hielo seco. El hielo seco tiene la capacidad de enfriamiento del doble que el hielo formado por la solidificación del agua. El vapor de CO<sub>2</sub> o "gas revertido" producido junto con el CO<sub>2</sub> sólido, al ser expandido, se recupera típicamente en un sistema de reversión y regresa al tanque de almacenamiento. Debido a su escaso contenido de CO<sub>2</sub> la atmósfera normal no es una buena fuente de producción de CO<sub>2</sub>. Éste se obtiene mediante corrientes de productos de desecho provenientes de diversos procesos industriales, tales como la combustión de algunos materiales y compuestos así como el gas natural. Las grandes cantidades de dióxido de carbono usualmente se almacenan y se transportan en forma líquida bajo presión elevada y refrigeración. Aunque no es realmente inerte, el CO<sub>2</sub> no reacciona con muchos materiales y, a menudo, se utiliza para varios propósitos, tales como la purga de tanques y

reactores, se adiciona a bebidas refrescantes para obtener su burbujeo característico, para aumentar la dureza de las aguas desalinizadas, para el ajuste del pH de algunos procesos o corrientes efluentes, en la industria de la panificación se utiliza para dar volumen a la masa al calentarse o exponerse a ácidos; como atmósfera de almacenamiento; el hielo seco se usa para abatir la temperatura de los congeladores en los lugares de distribución de helados, nieves, productos congelados; en el medio artístico se usa para la creación de efectos especiales; también se utiliza para llenar ciertos tipos de extinguidores de fuego ya que se acostumbra confiar en sus propiedades inertes, su densidad y baja temperatura a la que es liberado de su almacenamiento a alta presión; en grandes cantidades el  $\text{CO}_2$  se puede utilizar como un fluido de transferencia de calor a baja temperatura o como parte de un sistema de cascada mecánica de refrigeración, etc. Sin embargo, se deben tomar ciertas precauciones al manejarlo cotidianamente, ya que puede ocasionar asfixia si se inhala a alta presión. El  $\text{CO}_2$  es un dilatador cerebral. En concentraciones entre el 2 y 10% puede ocasionar náusea, mareo, cefalea, confusión mental, aumento de la presión arterial y frecuencia respiratoria. Arriba del 8% produce náusea y vómito; las concentraciones por arriba del 10% ocasionan inconciencia, excitación, respiración acelerada, ardor de la fosas nasales y garganta, sofoque y muerte; puede dañar el ganglio retinal, y el sistema nervioso central en forma crónica. El contacto con el  $\text{CO}_2$  en forma de gas frío puede ocasionar el congelamiento del tejido expuesto al mismo. La humedad del aire puede conducir a la formación de gas carbónico, el cual puede irritar los ojos. El  $\text{CO}_2$  es más pesado que el aire y no se debe permitir

su acumulación en áreas bajas. Sus rutas de acceso son: la inhalación, la piel y el contacto con los ojos. (Chemweek, 2006)

Su estructura de resonancia es la siguiente (Fig. 2):



Fig. 2 Estructura de resonancia del CO<sub>2</sub>.

Le permite reaccionar con material nucleofílico como las aminas, especialmente con aquéllas primarias sin carga, para formar ácido carbámico (Fig. 3)

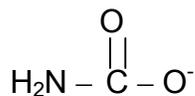


Fig. 3.- Ión Carbamato

(Lehninger, *et al.*, 1995) en una reacción reversible en soluciones neutras o ligeramente alcalinas. Así, el CO<sub>2</sub> puede cambiar reversiblemente las propiedades físicas y bioquímicas de los constituyentes celulares. La selectividad del CO<sub>2</sub> puede causar cambios en la dirección de las reacciones enzimáticas, ya sea la activación de una enzima particular en un tejido o su inhibición en otro. El CO<sub>2</sub> se acumula en algunas regiones ocasionando levantamientos de la presión local, los cuales pueden ser suficientes para iniciar actividades específicas (efectos de umbral).

Desde el punto de vista molecular, la reacción del CO<sub>2</sub> con las aminas primarias muy probablemente ocurre con los aminoácidos, péptidos y proteínas de la célula. En estos tres casos se ha observado la formación del carbamato. Los cambios observados en las propiedades químicas asociadas con

estas reacciones son notables. Por ejemplo, las sales de calcio de los aminoácidos son normalmente muy insolubles. Sin embargo, a medida que se forma el ión carbamato por la reacción del  $\text{CO}_2$  con las aminas, también puede ocurrir la solubilización de estas sales de metales de aminoácidos que normalmente son insolubles. La reacción del  $\text{CO}_2$  con los grupos amino del sitio de unión de la coenzima con la enzima puede inhibir la unión de ésta con la enzima correspondiente. El transporte de iones a través de las membranas también puede verse afectado por el  $\text{CO}_2$ . Si los grupos amino de las proteínas estructurales cambian temporalmente sus cargas positivas a negativas cuando reaccionan con el  $\text{CO}_2$  favorecen el transporte de iones positivos e inhiben el transporte de los negativos (Mitz, 1979).

Las características de las cadenas laterales ionizables de los aminoácidos dependen del pH, de ahí que la actividad enzimática varíe con los cambios en el mismo provocados por las altas concentraciones de  $\text{CO}_2$ . Cuando se suscitan cambios extremos en el pH la estructura terciaria de la proteína se puede disgregar desnaturalizándose. Incluso en valores moderados de pH, en los que la estructura terciaria no se ha disgregado, la actividad enzimática puede depender del grado de ionización de ciertas cadenas de aminoácidos laterales, y el perfil del pH de una enzima puede sugerir la identidad de aquéllos residuos (Palmer, 1991).

Se piensa que el  $\text{CO}_2$  cambia las propiedades de la superficie de las mitocondrias, como la solubilidad, el transporte de intermediarios metabólicos, actividad enzimática gracias a una composición lipídica específica de su

membrana que le permite, por ejemplo a las enzimas mitocondriales actuar más eficientemente con su sustrato en el ambiente acuoso mitocondrial (Mitz, 1979).

En la membrana, el CO<sub>2</sub> puede cambiar las cargas positivas del grupo amino de las proteínas en iones negativos de ácido carbámico, los cuales pueden favorecer la difusión de los iones positivos en lugar de los negativos. Este cambio de cargas puede ayudar a que la membrana altere su composición; así, se pueden abrir o cerrar hoyos o canales en la membrana debido a la atracción o repulsión de cargas similares u opuestas (Mitz, 1979). Frenkel y Patterson (1974) encontraron en el corazón de las peras 'Bartlett' (tejido del ovario confinado por los haces vasculares concéntricos internos) alteraciones en los sistemas de membranas, incluyendo la de la mitocondria, plástidos, tonoplasto y citoplasma cuando se sometieron estos frutos a una atmósfera de almacenamiento con concentración de 10% de CO<sub>2</sub> a 0°C por 90 días. Ellos declararon, así, una pérdida de organización celular, la cual podría explicar la naturaleza del efecto dañino del CO<sub>2</sub> en dichos tejidos del fruto.

## ii) FERMENTACIÓN

De acuerdo con una definición formal, fermentación es la degradación anaerobia de los carbohidratos (Fidler, 1968; Richter, 1972; Kruger, 1990; Lehninger, *et al.*, 1995) e involucra un desvío de la respiración normal hacia la producción fermentativa de ETOH, ácido láctico, ácido butírico, ácido fórmico, ó ácido propiónico cuando el oxígeno molecular no es un aceptor terminal de

electrones (Richter, 1972; Miernyk, 1990; Lehninger, 1995). En la mayoría de las células vegetales, el ETOH y el CO<sub>2</sub> son los principales productos de dicho metabolismo anaerobio (Fig. 5), con pequeñas cantidades adicionales de ácido láctico, el cual se forma en algunos tejidos vegetales, como chícharos en germinación, frijoles, soya, lenteja y maíz (Leblová *et al.*, 1974).

Se ha reportado que durante la anaerobiosis, la producción de ETOH en el tejido vegetal también se acompaña de un aumento en la concentración de ACET, y que la proporción ETOH/ACET es de aproximadamente 100:1 (Norman y Craft, 1971). Chen y Chase (1993) explican estos resultados debido a la inducción de la enzima piruvato descarboxilasa (PDC) (EC 4.1.1.17) (Enzyme Nomenclature, 1984), la cual es activada por el Mg<sup>++</sup> y requiere de pirofosfato de tiamina (“codescarboxilasa”) como coenzima (Richter, 1972). El pirofosfato de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>). El anillo tiazol de su estructura puede perder un protón para producir un átomo de carbono cargado negativamente. Éste es un nucleófilo potente y puede participar en la catálisis covalente. Así, la piruvato descarboxilasa utiliza el TPP para catalizar la producción de ACET a partir del piruvato según la reacción que se muestra en la Figura 5. El paso de la descarboxilación real se facilita por la catálisis electrofílica a medida que el anillo de tiazol retira electrones. La reacción podría proceder en la ausencia de la enzima, sin embargo, el ACET formado tiende a reaccionar con el complejo TPP-acetaldehído (Fig. 4) para producir acetoína como producto final. La piruvato descarboxilasa estabiliza al complejo TPP-acetaldehído y evita que ocurra dicha condensación (Fig. 6) (Palmer, 1991).

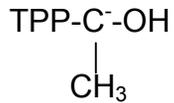
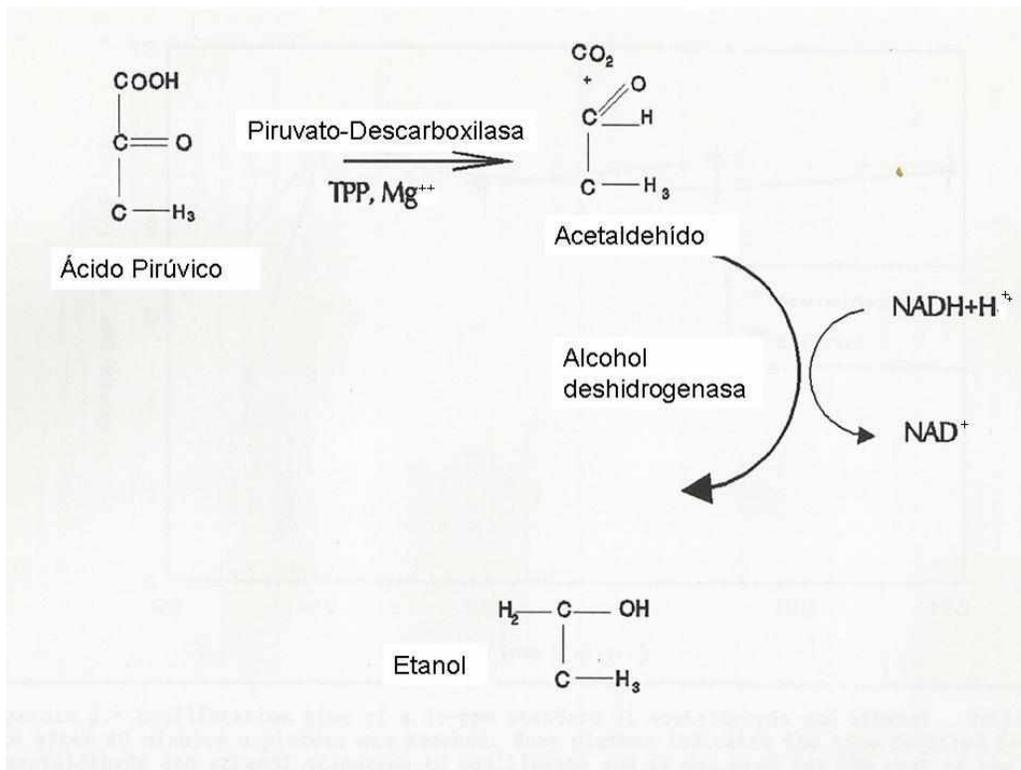


Fig. 4 Complejo TPP-acetaldehído

El ACET juega el papel de aceptor de hidrógeno en este proceso, es convertido a ETOH mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (alcohol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa; EC 1.1.1.1) (Fidler, 1968) (Fig.5), bajo dichas condiciones de estrés ambiental. Fidler (1968) realizó investigaciones sobre el metabolismo del ACET en tejidos vegetales como manzanas y demostró que éste es convertido ya sea a CO<sub>2</sub> o a ETOH.



$\text{NAD}^+$  = Nicotinadenindinucleótido  
 $\text{TPP}$  = Pirofosfato de tiamina (coenzima)  
 $\text{Mg}^{++}$  = Magnesio

Fig. 5. Reacciones del proceso de fermentación etanólica

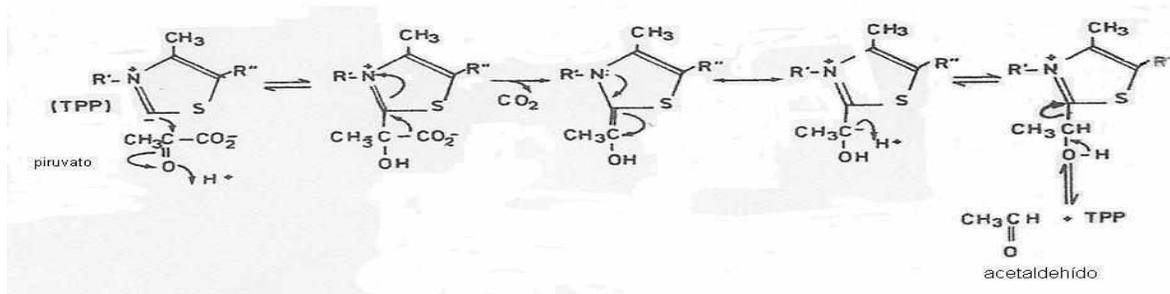


Figura 6. Acción del pirofosfato de tiamina (TPP)

La ganancia energética en el metabolismo anaerobio de la glucosa es de dos moles de ATP por cada mol de glucosa, lo cual es muy bajo cuando se compara con las 38 moles de ATP que se obtienen cuando una mol de glucosa es metabolizada aerobiamente en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Zemlianukhin e Ivanov, 1978; Palmer, 1991). En algunos tejidos vegetales la cantidad de glucosa utilizada a través de la respiración anaerobia no es proporcional a la cantidad de ETOH producido. Se producen ácidos orgánicos en lugar de ETOH; éstos incluyen al ácido láctico y, en algunos casos, incluso a los ácidos málico y cítrico (Richter, 1972; Palmer, 1991).

Al exponerse los productos hortofrutícolas al almacenamiento en altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  se puede ocasionar una desviación del metabolismo normal de los carbohidratos (glucólisis) hacia la producción de ETOH, incluso en presencia de  $\text{O}_2$  en abundancia (Smith, 1963; Jackson *et al.*, 1982; Kimmerer y

Kozlowski, 1982) parecido al “Efecto Crabtree”, en hongos y levaduras en donde al faltar  $O_2$  por efecto del  $CO_2$  favorece la acumulación de ETOH. Así, el aumento del consumo de glucosa deprime la respiración, disminuyendo a su vez el consumo de  $O_2$ . En *Sacch. Cerevisae* la respiración es restringida no sólo bajo condiciones anaerobias, sino también bajo la presencia de un medio rico en glucosa. (Matile, *et al.*, 1969). El fenómeno de la fermentación aerobia y la disminución de la actividad respiratoria ocurren debido a altas concentraciones de glucosa y fructosa como fuente de carbono. La glucosa inhibe específicamente la síntesis de enzimas respiratorias y ocasiona la formación de mitocondrias rudimentarias en las levaduras (Matile, *et al.*, 1969). Además se ha implicado la competencia entre la glucólisis y la cadena de transporte de electrones por el fosfato inorgánico en este último proceso (Koobs, 1972). De acuerdo con Kennedy *et al.* (1992), la glucólisis es una ruta ubicuita que opera tanto en condiciones aerobias como anaerobias. De ahí que, en una atmósfera normal se producen  $CO_2$  y  $H_2O$ , pero, si la atmósfera es rica en  $CO_2$  y/o hay carencia de  $O_2$ , operará la glucólisis hacia los procesos de fermentación.

Barford y Hall (1979) especularon que el “efecto Crabtree” puede deberse meramente a una adaptación muy lenta de las células a una condición completamente respiratoria. Los altos niveles de  $CO_2$  pueden inducir también la acumulación de ETOH con ACET, incluso en presencia de oxígeno en el ambiente de las plantas superiores (Thomas, 1925; Ranson, 1953; Smith, 1963). Ranson *et al.* (1957) encontraron una inhibición de la enzima succínil deshidrogenasa (E.C.1.3.99.1) (Enzyme Nomenclature, 1984), en el endospermo de frijoles (castor) en germinación. Así, cuando estos tejidos eran expuestos al aire, el

succinato se convertía vía fumarato en malato; sin embargo, cuando dicho tejido se exponía a una atmósfera de 20% de CO<sub>2</sub>, o más, el consumo de succinato se inhibía rápidamente. Miller y Evans (1956) reportaron que la enzima citocromo oxidasa de las plantas se inhibía con el bicarbonato.

Otro aspecto interesante es que la producción de ACET y ETOH no requiere necesariamente de células vivas. Este descubrimiento data de 1897 por Buchner, quien descubrió que se podían obtener los productos de la fermentación en el jugo exprimido de levaduras, exento de células (Richter, 1972).

## PRODUCCIÓN DE ACETALDEHÍDO ETANOL Y ÁCIDO LÁCTICO

El ETOH se puede encontrar ocasionalmente en bajas concentraciones en tejidos vegetales normales, saludables y sus niveles aumentan a medida que los frutos maduran (Smith, 1963). Sin embargo, se pueden desarrollar sabores no característicos en dichos tejidos vegetales debido a la acumulación de ACET y ETOH (Lipton y Harris, 1974; Kader, 1986). Existe controversia acerca de la fitotoxicidad de estos compuestos (Smagula, y Bramlage, 1977a; Jackson *et al.*, 1982; Perata y Alpi, 1991). En algunos tejidos vegetales, el ETOH puede ser retirado del almacén mediante ventilación del mismo, pero la remoción depende de la duración de la exposición de los productos a las condiciones particulares de la atmósfera modificada o controlada (Kader, 1986).

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27) también es una enzima importante en el proceso de fermentación como lo describe Miernyk (1990), ya que convierte al piruvato en lactato utilizando NADH como agente reductor. Esta enzima ha sido purificada y caracterizada a partir de mamíferos.

Aparentemente existen dos tipos de LDH en los tejidos vegetales: uno es constitutivo y el otro es inducido por condiciones de carencia de  $O_2$ . No todas las plantas poseen la actividad constitutiva de esta enzima, pero si está presente, no parece haber ninguna especificidad de tejido para su expresión. Las lactato deshidrogenasas inducibles son más comúnmente reportadas en preparaciones de raíces, semillas en desarrollo o embebidas y en órganos vegetales de reserva voluminosos y grandes. Las propiedades catalíticas y fisicoquímicas de las isozimas LDH de los vegetales son similares a las de los tejidos animales. El pH óptimo para su actividad *in vitro* es de 7 en la dirección de la reducción del piruvato y de 8.4 a 9.5 en la dirección de la oxidación del lactato. Todas las isozimas LDH de las plantas parecen ser proteínas tetraméricas. Son comunes las isozimas de la LDH en los tejidos vegetales y sus formas electroforéticas abarcan desde una hasta seis. Aparentemente, en la mayoría de los casos los productos de dos genes estructurales dan como resultado cinco isozimas heterotetraméricas (Dennis y Turpin, 1990).

La tolerancia a la carencia de  $O_2$  es muy diferente en los diversos tejidos vegetales. Así, Zemlianukhin e Ivanov (1978) hicieron una clasificación de plantas tolerantes y no tolerantes al estrés producido por la anaerobiosis, de acuerdo con el fenómeno llamado "Efecto Pasteur", definido como un incremento de la glucólisis bajo condiciones de supresión de la respiración normal, en los medios azucarados, en presencia de aire el metabolismo pasa espontáneamente al proceso anaerobio (Parés y Juárez, 1997; Yahia, 1993). El ácido pirúvico ya no se oxida, sino que es descarboxilado para formar ACET y  $CO_2$ , siendo el ACET reducido a ETOH (Isenberg, 1979; Yahia, 1993). Laszlo y Lawrence (1983),

mediante la técnica de electroforesis, observaron un aumento en la actividad de la PDC paralelo al incremento de la ADH en raíces de maíz expuestas a un ambiente anóxico. El aumento en los niveles de estas dos enzimas bajo dichas condiciones ambientales permite la producción de  $\text{NAD}^+$ , el cual es requerido para mantener funcionando la ruta de Embden-Meyerhoff Parnass. El incremento en los niveles de acción de estos dos sistemas enzimáticos permitiría el metabolismo de aquel exceso en la concentración del ácido pirúvico en el citoplasma, el cual sería el resultado de la inhibición de la función de la mitocondria bajo anaerobiosis. Ya que los genes estructurales de la PDC y la ADH no están ligados genéticamente, deben ser unidades de transcripción independientes y, por tanto, definen un sistema de aparente regulación coordinada de la expresión de genes estructurales de dos actividades enzimáticas metabólicamente relacionadas, ya que la PDC y la ADH catalizan reacciones secuenciales de la ruta Embden-Meyerhoff Parnass. Chen y Chase (1993) apoyan a dicha definición al encontrar la inducción de la PDC únicamente en frutos de jitomate expuestos a la anaerobiosis pero no así durante el proceso de maduración del jitomate. Speirs, *et al.*, (2002) encontraron que el aumento en la actividad de la ADH, en el fruto del jitomate, en el proceso de maduración, se correlacionaba fuertemente con la velocidad de suavización del mismo, sugiriendo así, que la inducción de la actividad de la ADH en el fruto era probablemente una función directa de la maduración. De manera que la presencia de esta enzima y sus productos de la fermentación están normalmente involucrados en el desarrollo del sabor de estos frutos.

Ha existido controversia acerca de la producción de ETOH por parte de las plantas bajo diferentes tipos de estrés del medio ambiente, como el O<sub>3</sub>, el encapsulado de las hojas en hielo, el medio ambiente anaerobio de los nódulos de las raíces (Donaldson *et al.*, 1985), ambientes con SO<sub>2</sub>, carencia de O<sub>2</sub> (Ke, *et al.*, 1991b), y/o altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, así como las inundaciones (bajos niveles de O<sub>2</sub>) (Kimmerer y Kozlowski, 1982). Sin embargo, parece que la producción de ETOH es un mecanismo importante por el cual las plantas pueden sobrevivir a dichos tipos de estrés y continúan respirando (Kimmerer y Kozlowski, 1982). Potencialmente el ETOH puede causar daño a las plantas inundadas (Kiyosawa, 1975; Vartapetian *et al.* 1978; Andrews y Pomeroy, 1979; Nandini-Kishore *et al.*, 1979; Jakson *et al.*, 1982; Perata *et al.*, 1986).

Con respecto al consumo de O<sub>2</sub>, se ha reportado que, en plantas resistentes al estrés causado por altos niveles de CO<sub>2</sub> o carencia de O<sub>2</sub>, la actividad respiratoria es mayor que en las sensibles. También muestran mayor habilidad para utilizar el ETOH y el ácido láctico, en sustitución de la glucosa, como sustratos para la respiración (Chirkova, 1978).

Los resultados de investigaciones sobre el metabolismo del ETOH bajo condiciones anaerobias indicaron que parte de este compuesto o sus metabolitos son transportados a otros órganos, tanto en plantas resistentes como sensibles. Sin embargo, se encontraron diferencias importantes con respecto a la utilización del ETOH entre ambos tipos de plantas (Chirkova, 1978; Cossins, 1978). Las condiciones anaerobias inducen un aumento de la oxidación de la glucosa por la

ruta alternativa de las pentosas fosfato en plantas sensibles a la hipoxia prolongada (*i.e.* más de 48 horas). Este efecto parece proteger a las plantas contra el envenenamiento por ETOH. En el caso de las plantas resistentes a la carencia de O<sub>2</sub>, se ha encontrado un aumento en la intensidad de la glucólisis, lo cual conduce a un aumento en su efectividad energética, que es consistente con la falta de acumulación de ETOH y ácido láctico encontrados en sus tejidos (Zemlianukhin e Ivanov, 1978; Ke *et al*, 1991b). Las plantas resistentes utilizan también el ETOH como sustrato para la producción de azúcar a través de la gluconeogénesis (Chirkova, 1978), lo cual revierte la dirección de las reacciones enzimáticas, resultando, principalmente, en la formación de ácidos orgánicos en lugar de la acumulación de ETOH. También se ha reportado la exudación de ETOH o su metabolismo en algunas plantas resistentes, tales como las raíces del betabel, y se dice que éstas tienen un metabolismo secundario realzado, ya que el ETOH puede convertirse en acetaldehído, acetyl CoA y, por tanto es sustrato potencial para la síntesis de muchos compuestos secundarios como los terpenos, alcaloides como los derivados de la pirrolidina, síntesis de ácidos grasos, síntesis de hormonas vegetales, etc. (Kenefick, 1963; Goodwin y Mercer, 1974; Chirkova, 1978).

Existe mucha controversia acerca del probable daño a los tejidos vegetales por el ACET más que por el ETOH (Smagula y Bramlage, 1977a,b; Stewart *et al.*, 1980; Kimmerer y Kozlowski; 1982; Perata y Alpi, 1991). Stewart. *et al.*, (1980) reportaron síntomas de daño por ACET en la lechuga romana, los cuales aparecían cuando ésta era expuesta a concentraciones del 3 al 6% de dicho

compuesto. Perata y Alpi (1991) reportaron daños inducidos por ETOH en células de zanahoria. Smagula y Bramlage (1977a) han cuestionado estas observaciones argumentando que el ACET podría emanar de los tejidos vegetales inmediatamente después de su producción. En cambio Morris *et al.* (1979) encontraron benéficos los efectos de los vapores de acetaldehído en fresas cosechadas mecánicamente, resultando en un retardo en la pérdida de sólidos solubles y la conservación de un buen color a la vista del consumidor. Los efectos de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> sobre la producción de ETOH en lechuga y otros productos pueden jugar un papel en la emanación de aromas y sabores desagradables debido a la fermentación que puede aparecer justo antes de cualquier otro desorden fisiológico como la aparición de manchas de color marrón (Stewart, *et al.* 1980). Por otro lado Lichter, *et al.* (2002) lograron controlar la putrefacción de las uvas por *Botrytis cinerea* sumergiendo los racimos en ETOH al 33% (v/v) bajo almacenamiento frío. Las bayas obtuvieron puntajes de evaluación sensorial más altos que las tratadas con dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), el cual, además resulta ser alergeno para algunas personas.

Otros factores que afectan la producción de ACET y ETOH en productos hortofrutícolas expuestos a las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> son:

## LUZ

Kimmerer y Kozlowski (1982) encontraron que la producción de ACET y ETOH era más rápida si los productos hortofrutícolas eran expuestos a ambientes estresantes en presencia de la luz, más que en la oscuridad.

Además de la intensidad luminosa, también es importante la duración de la exposición de los productos vegetales a la misma. El balance neto de carbono es importante (adquisición vs. utilización del carbono), ya que es normalmente deseable mantener al producto hortofrutícola en la misma condición cualitativa que existía cuando fue cosechado (la remoción del mismo en la zona de producción en donde se encuentran las plantas intactas). Los requerimientos fotosintéticos en postcosecha para las especies individuales en varios estados de su ciclo de vida se desconocen. Sin embargo, es probable que los requerimientos para la toma de carbono fotosintético necesarios para mantener la condición existencial de la planta estén, de alguna manera, por encima de la utilización respiratoria burda de la planta. Esto se debe a los usos no respiratorios del carbón en reacciones de mantenimiento. La adquisición fotosintética del carbón se puede mantener en o por encima de este punto crítico de mantenimiento con un rango de combinaciones de intensidad-duración de luz. No obstante, en algunas especies, si son expuestas a períodos prolongados a intensidades mayores, los cloroplastos son incapaces de almacenar apropiadamente el almidón adicional formado. Como consecuencia, la fotosíntesis es inhibida. Los cambios en la cantidad de energía luminosa que las plantas reciben a longitudes de onda particulares (calidad de la luz) a menudo se alteran dramáticamente después de la cosecha. Estos cambios

ocurren principalmente debido al uso de luz artificial, la cual no contiene la misma calidad espectral que la luz del sol, y del uso de material de sombreado que absorbe selectivamente la luz de ciertas regiones del espectro. Mientras que los cambios fotomorfogénicos en la planta debidos a la calidad de la luz son normalmente de una importancia mayor que los cambios en la velocidad fotosintética neta, la exposición prolongada de las plantas a la luz que no es espectralmente adecuada para la fotosíntesis comprometerá al mantenimiento de la calidad del producto (Kays, 1991).

### TEMPERATURA

De acuerdo con Magness (1920), existen tres factores principales que determinan la cantidad de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales a cualquier temperatura dada: (1) la velocidad de oxidación; (2) la permeabilidad de la piel o cobertura epidérmica al CO<sub>2</sub> y al O<sub>2</sub>; (3) la diferencia de presión del CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> dentro y fuera del producto hortofrutícola bajo estudio.

Los estudios electroforéticos de *Zea mays* han mostrado la existencia de formas alternativas en el sistema enzimático de la ADH, *i.e.*, isozimas que influyen en la “condición física” de las plantas individuales que las hacen soportar ambientes adversos, estresantes, tales como la anaerobiosis (Crawford, 1978). Algunas isozimas mostraron ser formas de la ADH termolábiles y, las menos activas, eran formas de la enzima lentas para migrar (Crawford, 1978).

Brecht *et al.*, (1973a) y Lipton (1987) encontraron que el daño por CO<sub>2</sub>, expresado como mancha parda en cultivares selectos de lechuga, era mayor a 0°C que a 2.5°C cuando se almacenaban en atmósferas con niveles de 5% de CO<sub>2</sub>.

### CONCENTRACIÓN DE O<sub>2</sub> Y CO<sub>2</sub>

Las bajas concentraciones O<sub>2</sub>, o su carencia causan el fenómeno de la fermentación en las bacterias, las plantas y los hongos (Patterson y Nichols, 1988; Ke *et al.*, 1991b). Las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> también pueden ocasionar fermentación incluso en presencia de niveles adecuados de O<sub>2</sub> (Smith, 1957; Lakshminarayana y Subramanyam, 1970).

### INTERACCIÓN DE ALTOS NIVELES DE CO<sub>2</sub> Y BAJOS NIVELES DE O<sub>2</sub>

Los efectos de las concentraciones reducidas de O<sub>2</sub> y altas concentraciones de CO<sub>2</sub> sobre la actividad respiratoria de los tejidos vegetales son aditivos. La combinación de 2% de O<sub>2</sub> y 10% de CO<sub>2</sub> ejerce aproximadamente el doble impacto de cualquiera de estos compuestos por sí mismo (Kader, 1985; Ke *et al.*, 1991a).

Algunos estudios acerca de los cambios fisiológicos que ocurren en frutos como los cítricos durante su almacenamiento en AC han indicado que el ETOH es un componente volátil que muestra un cambio substancial (Davies y Chace, 1969).

De ahí que se asuma que la cantidad de ETOH producida en los productos hortofrutícolas puede ser un buen índice de la sensibilidad de los productos a altos niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera de almacenamiento.

A pesar del conocimiento general que se tiene de las rutas bioquímicas de la producción de ETOH dentro de los tejidos vegetales, todavía no es clara la razón por la cual algunos productos hortofrutícolas son más sensibles que otros a las altas concentraciones de CO<sub>2</sub>.

Se ha intentado diseñar modelos de simulación por computadora para proporcionar ambientes óptimos para el almacenamiento de diversos productos hortofrutícolas (Shewfelt, 1993), sin embargo, dichos intentos han fracasado debido a que la sensibilidad al CO<sub>2</sub> puede ser influenciada por muchos factores tales como la estructura general del tejido vegetal, la parte de la planta, su genética, las condiciones en que ésta crece, la época de cosecha, el estado de madurez, sus mecanismos de defensa endógenos como la naturaleza de la superficie externa del tejido (Kader y Morris, 1977; Kays, 1991; Shewfelt, 1993), la severidad de su exposición a ambientes adversos, por lo que se ha sugerido que la tendencia sea hacia el diseño sistémico o integral de técnicas de almacenamiento en atmósferas controladas y modificadas que consideren todos los factores antes mencionados (Shewfelt, 1993). Por ejemplo, aquéllos productos voluminosos son susceptibles de producción y acumulación de ETOH debido a la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> creada dentro de ellos mismos. Se cree que el CO<sub>2</sub> se acumula debido a la disrupción de las células con la consecuente liberación de sus contenidos los cuales bloquean los espacios intercelulares, y los canales de intercambio gaseoso a medida que el fruto madura (Burton, 1982a,b). Por lo

tanto, con el objeto de realizar una descripción general de la sensibilidad al CO<sub>2</sub>, se deben considerar muchos factores como estos.

Los ácidos de los alimentos pueden afectar la calidad de los mismos de muchas maneras. Pueden actuar como nutrientes, componentes del sabor, realzadores del sabor, agentes gelificantes y quelatos para ciertos iones desestabilizantes, supresores del oscurecimiento enzimático, y entidades reductoras para la estabilización de reacciones de óxido-reducción como la oxidación del ácido ascórbico (Sadler, 1998).

Los ácidos orgánicos pueden ser determinantes en la existencia de microflora en los alimentos. Muchos microorganismos patógenos y causantes de la descomposición de los productos alimenticios son incapaces de crecer en alimentos con alta acidez. La proporción de azúcares y ácidos provee una predicción precisa de la acidez de muchos alimentos agrios. El valor de dicha proporción es una de las pocas pruebas objetivas que se correlaciona bien con la percepción organoléptica (Sadler, 1998).

La acidez de algunos productos hortofrutícolas puede alterarse como resultado de su exposición a altos niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera de almacenamiento (Smith y Raven, 1979).

Siempre ha existido mucho interés en el estudio de la variación del pH intracelular y su regulación en las células de las plantas superiores expuestas a

ambientes estresantes, lo cual puede conducir a la producción, y consiguiente acumulación, de ETOH. Dicho interés se debe al supuesto de que el pH intracelular podría controlar la carboxilación a través de los efectos que ejerce en la actividad enzimática (Smith y Raven, 1979). Se ha reportado que la exposición de los tejidos vegetales a altos niveles de CO<sub>2</sub> causa cambios físicos en el balance iónico y el pH (Wager, 1974b).

En una atmósfera con alto contenido de CO<sub>2</sub> este gas penetra a la célula. Una vez adentro se hidrata con un coeficiente de difusión aproximadamente 10,000 veces menor que en su fase gaseosa. Genera HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sup>+</sup> (así como otros carbonatos) lo cual puede afectar al balance iónico, y por tanto, al pH intracelular (Wager, 1974b; Bown, 1985). Con estos cambios las funciones metabólicas normales no podrían ser sostenidas (Siriphanich y Kader, 1986).

Smith (1963) indicó que el efecto del CO<sub>2</sub> sobre el contenido total de ácidos de las frutas no mostraba un panorama muy claro. Allen y Smock (1937) encontraron una correlación significativa entre los cambios en la composición total de ácidos y la composición de las atmósferas, en algunos productos hortofrutícolas. Stoll *et al.* (1958) reportaron que el contenido de acidez titulable de dos cultivares de manzana se incrementaba después de ser expuestos al almacenamiento en atmósferas controladas.

Existe controversia sobre el efecto del CO<sub>2</sub> en el pH. Thornton (1937) estudió los efectos de las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> en diversos productos hortofrutícolas.

Analizó el pH del jugo extraído mediante un electrodo de quinhidrona. Encontró en todos los casos un aumento en el pH después de la exposición de los productos a altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, el aumento fue mayor conforme aumentaban los niveles de CO<sub>2</sub> y a mayor tiempo de exposición. Este cambio fue del orden de 0.9 de unidad de pH en tejidos vegetales que originalmente presentaban un pH de 5.0 (Smith, 1963). Miller y Dowd (1936) encontraron un aumento en el pH en jitomates almacenados seis días a 10° ó 20°C en 50% de CO<sub>2</sub>. Lebermann *et al.* (1968) observaron efectos similares cuando trabajaron con brócoli. Roberts *et al.* (1984a y b) encontraron una disminución en el pH en ápices de raíces de maíz cuando fueron expuestas a hipoxia o a ambientes inundados.

Wager (1974a) expuso chícharos verdes a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (5 a 30%) y observaron que la concentración interna normal de CO<sub>2</sub> era muy alta. Si se modificaban los niveles de CO<sub>2</sub>, cambiaba el contenido de malato, tendiendo así a mantener un pH constante. De ahí que, posterior a la transferencia a altos niveles de CO<sub>2</sub> (5 al 30%), el contenido de malato disminuía rápidamente en las primeras horas, y después lo hacía más lentamente por hasta 20 horas. Cuando se regresaban los chícharos a la atmósfera de aire la concentración de ácido málico aumentaba rápidamente hacia su contenido normal. Se encontraron respuestas similares en peras (Frenkel y Patterson, 1977). Buescher y Brown (1979) y Buescher y Adams (1983) reportaron una disminución en el ácido málico después de exponer ejotes a altos niveles de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, en otros tejidos tales como las plántulas de berro, se descubrió acumulación de malato después de ser éstas expuestas a altos niveles de CO<sub>2</sub> (Wager, 1974b). Ranson (1953) mencionó que en plantas con metabolismo ácido de las Crasuláceas (CAM), en

las que el CO<sub>2</sub> se fija en ácido málico en la fase oscura, la síntesis de ácido se promovía alimentando a la atmósfera de almacenamiento con CO<sub>2</sub> en concentraciones de hasta 5%. Por arriba del 10% éste se retardaba progresivamente; y se hacía más lento o se detenía por arriba del 50% de CO<sub>2</sub>.

Por otro lado, Frenkel y Patterson (1977) observaron una disminución del ácido cítrico en peras de la variedad Bartlett cuando se les almacenó en atmósferas con altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, mientras que Wager (1974b) no encontró efecto en chícharos verdes con respecto a su contenido de ácido cítrico.

En 1953, Ranson expuso hojas de kalanchoe a diferentes tipos de atmósferas, tales como las de 20 a 90% de CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>; nitrógeno puro, CO<sub>2</sub> puro, ó 1% de O<sub>2</sub> en N<sub>2</sub>. Otros experimentos mostraron disturbios en el metabolismo de los ácidos, y un resultado común fue la acumulación de succinato. Hulme (1956), Frenkel y Patterson (1977), y Wager (1974b) señalaron resultados similares en manzanas, peras Bartlett, y chícharos verdes, respectivamente. Wager (1974b) también mencionó que cuando los chícharos retornaban a la atmósfera de aire, los niveles de ácido málico se incrementaban rápidamente y volvían a su contenido normal, y el contenido de ácido succínico disminuía lentamente. La acumulación de ácido succínico en los productos hortofrutícolas expuestos a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> fue mencionada también por Yahia y Carrillo-López en aguacate (1993).

Las áreas productoras de cultivos hortofrutícolas a menudo se encuentran lejos de los centros de distribución y de mercadeo, así como de la industria del

procesamiento de estos productos. Existe la necesidad de proteger a dichos productos contra el deterioro durante el transporte y el mercadeo dada la abundancia de pérdidas postcosecha debidas, principalmente, a pudriciones ocasionadas por microorganismos (Anónimo, 1979). El uso de atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> es una opción plausible para retardar la senescencia de los productos hortofrutícolas percederos; sin embargo, es importante también entender el efecto de las AC y AM para aplicarlas a nuevos productos, considerando que algunos de ellos pueden ser perjudicados por las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en su atmósfera de almacenamiento.

A pesar de todos los desarrollos teóricos sobre las causas y formas en que el ETOH se acumula en los frutos, muy poco se ha discutido acerca de la forma o tendencias en las que esta acumulación se lleva a cabo y si es posible o no determinar tendencias o patrones generales en este proceso. De manera general e hipotética se puede considerar que, potencialmente, existen tres tipos de formas o patrones en los que el ETOH se acumula en los tejidos vegetales (Fig. 7).

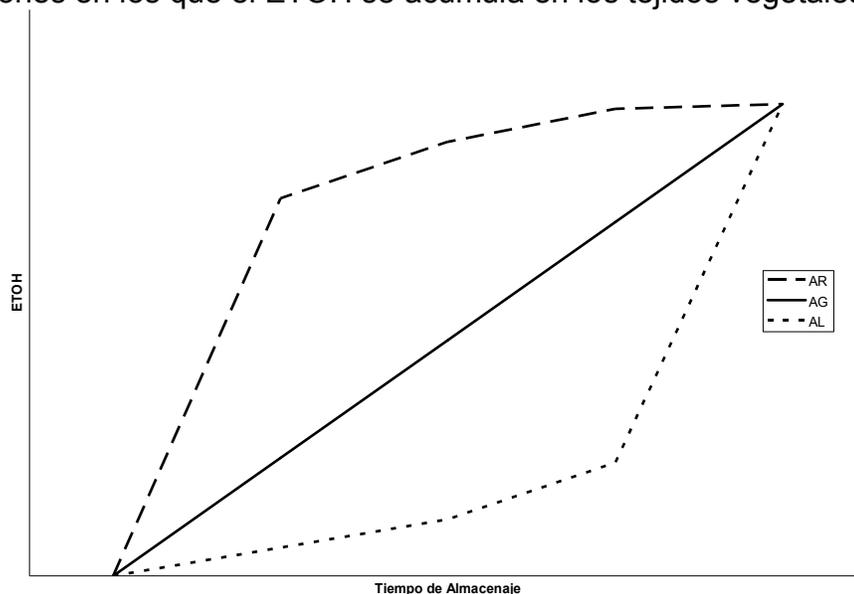


Fig.7. Modelos propuestos de acumulación de ETOH de los productos hortofrutícolas estudiados. AR Acumulación Rápida. AG Gradual v AL Lenta

El primer modelo se puede llamar de acumulación rápida (AR). En aquellos frutos que presenten este modelo el ETOH se acumula rápidamente en los tejidos alcanzando la saturación de los mismos al poco tiempo. En el segundo modelo la acumulación es gradual (AG), es decir, el ETOH se va acumulando en los tejidos a un paso más o menos constante, conforme se va produciendo a lo largo del período de almacenamiento. El tercer modelo o patrón puede ser denominado como modelo de acumulación lenta (AL). En este patrón la acumulación de ETOH en los tejidos es muy lenta en un principio y, cuando alcanza un punto de saturación en el tejido, o bien se alcanza la capacidad de actividad de las enzimas que lo modifican, es cuando retoma a un paso acelerado en la acumulación del ETOH.

En las revisiones que sobre la literatura existente se hicieron para la elaboración de esta tesis, no se pudo detectar que alguien haya propuesto, de manera formal, la existencia de estos patrones de acumulación de ETOH de los frutos sometidos a condiciones de fermentación, sin embargo, en la literatura sobre fisiología vegetal, particularmente se han presentado desarrollos similares en los que los patrones generales explican el comportamiento general de algunos parámetros, si bien no de manera exacta (Kid y West, 1930; Alexander y Grierson, 2002). Éste es el caso de los patrones de producción de  $\text{CO}_2$  en los llamados frutos climatéricos y no climatéricos. En los primeros lo importante es que la actividad respiratoria y la producción de etileno tienen un incremento repentino

que dispara una serie de reacciones enzimáticas al interior del fruto (Wills, *et al.*, 1989). Al igual que en el caso de la actividad respiratoria, en los frutos climatéricos y no climatéricos, los patrones aquí presentados pueden variar en la forma exacta, en la intensidad de la acumulación, o incluso en el tiempo al que se presentan (de ahí que en la gráfica de la figura 7, antes mostrada, no se pongan unidades ya que cada fruto variará en la cantidad de acumulación, según su sensibilidad y el tiempo de acumulación). La existencia de diferentes patrones de acumulación de ETOH, al igual que de la producción del etileno en frutos climatéricos y no climatéricos, obedece a la forma particular en que los frutos se han adaptado a condiciones particulares de estrés y probablemente responde a la acción de enzimas específicas o incluso a formas alternativas de isozimas que pueden activarse por determinadas reacciones químicas que se dan en el interior de la célula como respuesta a los estímulos del CO<sub>2</sub>, que como se mencionó arriba, pueden ser muy variadas. En esta tesis se presenta como una propuesta de investigación el poder determinar si es que estos diferentes modelos de acumulación de ETOH están presentes en la naturaleza y son presentados por alguno o algunos frutos, o si bien la acumulación de ETOH en todos los productos hortofrutícolas es igual y no existen patrones alternativos en la acumulación de este compuesto. Estos planteamientos han sido sometidos a evaluación por la comunidad científica internacional (Yáñez *et. al* 2000, ver apéndice II), sin que a la fecha se haya refutado su validez.

## 2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> (en presencia de O<sub>2</sub> a concentraciones atmosféricas normales), producen cambios en el metabolismo fermentativo en diferentes productos hortofrutícolas almacenados en refrigeración.

### 2.1 OBJETIVOS

- Este estudio se enfocará en la acumulación de ETOH en tejidos vegetales en respuesta a su exposición a altos niveles de CO<sub>2</sub> (30% v/v) (en combinación con oxígeno a niveles lo más cercanos posible a los atmosféricos, 16 - 18%, ya que los altos niveles de CO<sub>2</sub> tienden a desplazar un poco al O<sub>2</sub>).
- Agrupar los diversos patrones de acumulación de etanol (ETOH).
- Determinar si el grado de madurez influye en este patrón de acumulación.
- Investigar si suceden cambios en el pH y la acidez total titulable en homogeneizados de pulpa de los diversos productos hortofrutícolas.
- Evaluar los patrones de cambio en algunos ácidos orgánicos del ciclo de Krebs.
- Determinar si hay cambios en los sólidos solubles totales de diversos productos hortofrutícolas almacenados en una atmósfera de 30% (v/v) de CO<sub>2</sub>, balance aire (16-18% de O<sub>2</sub>) bajo refrigeración.

## 2.2 METAS

- Determinar la sensibilidad en 20 productos hortofrutícolas, en almacenamiento expuestos a tiempos cortos sometidos a atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, y refrigeración comercial (7±1°C).
- Determinar si existe alguna relación entre los parámetros físicos y químicos de los diversos productos hortofrutícolas bajo estudio y su respectiva acumulación de etanol.
- Evaluar la influencia de la temperatura de almacenamiento en algunos productos sensibles al daño por frío expuestos a una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> sobre su acumulación de ETOH.
- Observar si suceden cambios en el sabor de los productos hortofrutícolas estudiados como consecuencia de cambios en su composición química.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 FUENTES Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para los propósitos de este estudio se obtuvieron 20 diferentes productos hortofrutícolas (ver tabla 2) de la Central de Abasto del D.F. A su llegada al laboratorio de frutas de la U.A.M.I se procedió a lavarlos con detergente y agua, con el propósito de realizar las prácticas de limpieza que se llevan a cabo normalmente en bodegas y empacadoras comerciales para eliminar microorganismos que pudieran influir en la producción de ETOH; se secaron, se seleccionaron mediante una tabla de números aleatorios, y se marcaron.

##### 3.1.1. Evaluaciones físicas

Se pesó (en g.), se midió la longitud y el ancho (en cm) de cada uno de los productos bajo estudio. El color fue medido utilizando el colorímetro Hunter Lab<sup>®</sup>, basado en un sistema triestímulo consistente en la medición del brillo u oscuridad (L), y colores de los productos, en donde **a** es una función utilizada para medir el color verde (**-a** es verde; **+a** es rojo) y **b** se utiliza para medir el color amarillo (**+b**) y el azul (**-b**) (Francis y Clydesdale, 1975).

Se colocaron 3 productos o, en su caso, cantidades similares de producto, en cada contenedor con capacidad de 4.5 L con entradas conectadas a un tubo dosificador de gases en un sistema abierto que proporcionaba una atmósfera de

30% de CO<sub>2</sub> (v/v) balance aire (23.14 kPa de CO<sub>2</sub>, según cálculos basados en el texto de Morris (1987), (considerando que el valor absoluto de la concentración antes dicha en unidades de presión se ve disminuido debido a las condiciones de la presión atmosférica de la altitud de la Ciudad de México [2 227 m.s.n.m., presión atmosférica de aproximadamente 78.126kPa]) con el objeto de obtener resultados en corto tiempo, ya que no se consideran dichos niveles, usados de este gas en el presente estudio, a nivel comercial. La velocidad del flujo que pasaba a través de dichas cámaras fue de aproximadamente 100 mL/min. Se colocaron 3 productos o, en su caso (por ejemplo, fresas o uvas), 250 g de los mismos, en contenedores de 4.5 L de capacidad pero a los que se les hacía pasar un flujo de 100mL/min de aire con composición igual al atmosférico, los cuales sirvieron como testigos. Todos los contenedores se mantuvieron a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 80% H.R. (interna), siguiendo las recomendaciones de simplicidad establecidas por el método científico: “Aún cuando la realidad es sumamente compleja, el estudio de ella puede simplificarse. La pregunta científica debe ser simple, lo cual significa que se refiere sólo a un aspecto sencillo en medio de toda la complejidad del fenómeno estudiado. Esto indudablemente ayuda a la claridad y a la precisión” (Gutiérrez, 1989). Este enunciado sugiere el mantener todas las condiciones del experimento iguales (temperatura y humedad relativa de los contenedores, según los resultados de una encuesta en establecimientos comerciales en los que la temperatura promedio de los refrigeradores en los que se almacenaban las frutas y hortalizas fue de  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) excepto la que se desea aislar, en este caso los niveles de CO<sub>2</sub> que componían la atmósfera de almacenamiento de los productos

hortofrutícolas estudiados. Se usaron 3 réplicas para cada observación del tratamiento. Se realizaron muestreos a la llegada de los productos al laboratorio y después aproximadamente a las 12, 24, 36, 48 y 52 horas de almacenaje, para la determinación de ETOH por cromatografía de gases.

En los casos en donde se tuvo duda sobre los resultados respecto a la acumulación de ETOH, es decir, si se desconocía si su respuesta se debía a los efectos de la baja temperatura de almacenamiento, dado que eran sensibles al daño por frío, y se sabe que éste puede incrementar el efecto del CO<sub>2</sub> (Corrales-García, 1997; Yahia, 1997), o si dicha acumulación de ETOH se debía al efecto que en ellos producía el almacenamiento en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>, se corrieron experimentos de doble control. Dichos experimentos consistieron en exponer a los productos hortofrutícolas como el limón, la tuna y el pepino, tanto al almacenamiento en aire como a la atmósfera de 30% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire, a las temperaturas recomendadas para su almacenamiento (10±1°C). En el caso del jitomate y el plátano no se dispuso de condiciones adecuadas de almacenamiento a 14°C, por lo que se hipotetizaron los resultados a partir de aquéllos obtenidos en los otros tres productos.

### 3.1.2. FUENTE DE ABASTECIMIENTO DE GASES

La mezcla de 30% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire se obtuvo de tanques de gas comprimido comercial certificado (Praxair). La mezcla se hizo pasar por un tubo dosificador con válvulas de control individuales para cada contenedor, según el diseño de Shaw y Kattan (1971), el cual fue modificado cambiando de tamaño las

válvulas originales por unas más pequeñas y creando un sistema semiabierto, verificando los niveles de CO<sub>2</sub> por cromatografía de gases.

### 3.1.3. CROMATOGRAFÍA DE GASES

#### 3.1.4. Determinación de la acumulación de ETOH

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Varian® 3700 con detector de ionización de la flama bajo las siguientes condiciones: nitrógeno como gas acarreador, 225 mL/min.; hidrógeno a 29.5 mL/min.; aire a 260 mL/min.; temperatura del inyector a 120°C; temperatura del detector a 120°C; columna CP.SIL 8 CB, a 30°C.

Para el análisis de compuestos volátiles como el ETOH se utilizó el analizador del espacio de cabeza del vial que contenía a la muestra gaseosa. Se contó con un sistema automatizado en donde la muestra se equilibraba en un horno por un período, durante el cual se permite la disolución de los componentes para descomponerse en la fase gaseosa. Esta fase gaseosa era posteriormente muestreada en una espiral y enjuagada de regreso al cromatógrafo de gases. La muestra era posteriormente transferida hacia el puerto de inyección y, subsecuentemente, hacia la columna. Se trata del sistema de purga y trampa que se utiliza cuando se necesita una sensibilidad más alta ya que se pueden utilizar volúmenes de muestra más grandes. En lugar de estar limitado a la cantidad de muestra que se descompone en el espacio de cabeza se tenía una corriente de gas, la cual constantemente esparcía la solución gaseosa, acuosa o la fase sólida,

separando la mayoría o todos los componentes de la muestra, los cuales eran posteriormente atrapados y luego, subsecuentemente, eliminados totalmente de la trampa y, posteriormente, conducidos hacia el sistema del cromatógrafo de gases (Fig. 8).

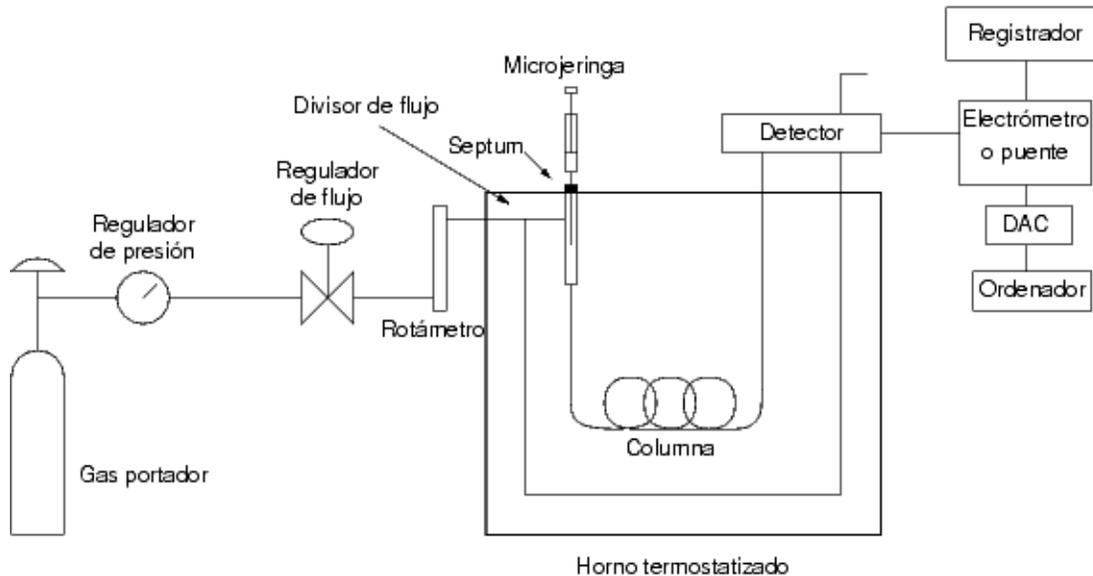


Fig. 8. Cromatógrafo de gases.

Debido a su relativamente alta sensibilidad a la mayoría de los compuestos orgánicos, el detector de ionización de la flama es un arma muy poderosa para la cromatografía de gases. La respuesta del detector no cambia marcadamente con las variaciones dadas por el cambio de la velocidad de flujo, presión o temperatura de la fase móvil del gas y, así, proporciona un detector confiable, estable. También tiene una respuesta lineal sobre un amplio rango de masas, abarcando, generalmente, varios órdenes de magnitud. La figura 9 muestra un diagrama esquemático de un detector de ionización de la flama.

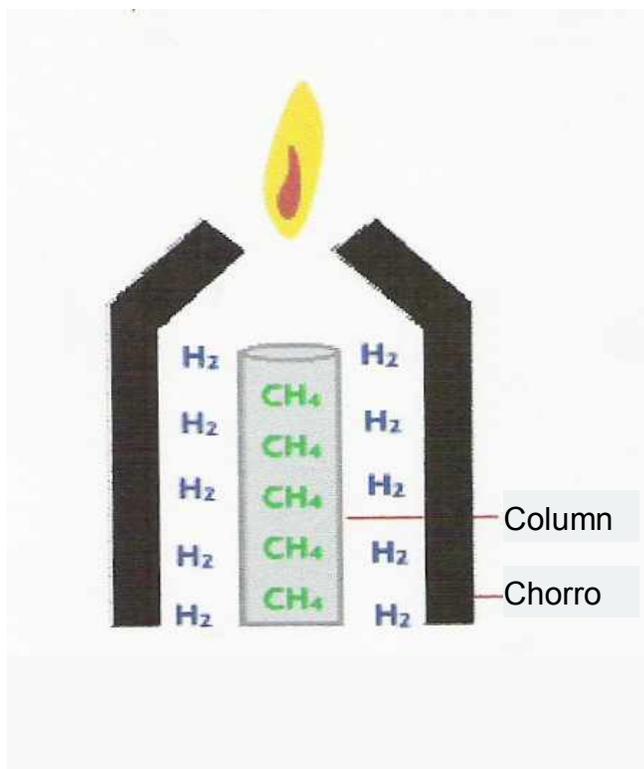


Fig. 9. Detector de ionización de la flama.

Los compuestos orgánicos que se eluyen de la columna cromatográfica son “barridos” hacia la flama, la cual los quema en una mezcla de hidrógeno y aire dentro de lo que es llamado el “detector a chorro”. Durante este proceso los compuestos orgánicos se descomponen en fragmentos de carbono y adquieren una carga positiva (*i.e.*, se ionizan), de la superficie del chorro que sirve como un electrodo. Estos fragmentos de carbono ionizado son detectados por un segundo electrodo, ligeramente corriente abajo, en la celda del detector. Esta señal es amplificada y enviada al sistema de procesamiento de datos.

Se llevaron a cabo ensayos preliminares dirigidos a determinar métodos encaminados a obtener resultados reproducibles trabajando en una cámara de

refrigeración a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$  para la preparación de todas las muestras bajo estudio, con el objeto de evitar la pérdida de muestra por evaporación del ETOH cuya presión de vapor es de 5.8 kPa a temperatura ambiental, usando soluciones estándar de ETOH absoluto (Merck<sup>®</sup>, 99.9% grado de pureza). El método seleccionado para la determinación de ETOH se enfocó en el uso de los gases encontrados en el espacio de cabeza para reducir así la interferencia de sustancias menos volátiles.

La preparación de estándares consistió en la elaboración de soluciones de ETOH (10 mL) en concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 0  $\mu\text{L/L}$  en agua helada desionizada. Se colocó cada solución en un frasco vial de 50 mL de capacidad (el cual contenía 10 mL de una solución fría ( $5^{\circ}\text{C}$ ) de NaCl 3M para evitar la evaporación del ETOH, (considerando como un insignificante error experimental constante que los medidores volumétricos están calibrados a  $20^{\circ}\text{C}$ ). Se utilizó la solución salina para evitar diferencias entre la fuerza iónica de las muestras que pudiera haber influido sobre las diferencias de presión de vapor de los gases. Se adicionaron al vial 10 mL de n-propanol (Merck<sup>®</sup> 99.9% de pureza) para llevar a cabo el análisis cromatográfico bajo el método del “estándar interno”, el cual es útil en los análisis detallados de pureza de sustancias químicas. Esta técnica permite la cuantificación exacta de componentes individuales sin la necesidad de tener una matriz de muestras constante o cierta cantidad de muestra a inyectar en el cromatógrafo. La muestra de calibración necesita contener sólo el material del estándar interno y los componentes de interés, en este caso, el ETOH. El tamaño del pico del estándar interno, en el cromatograma, debe ser ligeramente más grande que el pico de interés. El área del pico del estándar

interno no debe variar por más de un factor de 10 de las áreas de los picos de interés. El valor del factor de referencia (RF) corrige la proporción de respuesta entre el componente y el estándar interno. Debido a esto, es necesario que las unidades de medida siempre sean las mismas a través de la calibración y el análisis de las muestras problema. Los viales fueron sellados con tapones especiales de hule, engargolados con tapón de aluminio y se mantuvieron por al menos veinte minutos en un baño María a 30°C para permitir el equilibrio de presiones parciales de los gases de las muestras. Se realizaron ensayos preliminares con un estándar de 100 µL/L para determinar el tiempo necesario para alcanzar dicho equilibrio, el cual fue de 15 minutos. Después de este lapso se tomaron 0.3 mL de gas del espacio de cabeza del vial y se inyectaron al cromatógrafo de gases de acuerdo a las condiciones antes mencionadas. Se elaboraron curvas estándar de ETOH para estas determinaciones cromatográficas.

El método del estándar interno se basa en los siguientes cálculos:

La calibración para cada componente de interés es "i":

$$RF_i = \frac{(CC_i)(\text{Área}_{is})}{(\text{Área}_i)(CC_{is})}$$

En donde:

$RF_i$  = Factor de respuesta para el componente i.

$CC_i$  = La cantidad de componente i utilizada en la muestra de calibración.

$\text{Área}_i$  = El área del pico del componente i.

$\text{Área}_{is}$  = El área del pico del estándar interno.

$CC_{is}$  = La cantidad de estándar interno utilizado en la muestra de calibración.

El análisis de cada componente de interés, i es el siguiente:

$$\text{Conc}_i = \frac{(IS) ((RF_i) (\text{Área}_i)) (XF)}{(SA) ((RF_{is})(\text{Área}_{is}))}$$

En donde :

$\text{Conc}_i$  = La cantidad de componente i presente en la muestra bajo análisis.

IS = La cantidad de estándar interno añadida a las muestras bajo análisis.

Las unidades de medida deben ser las mismas que las utilizadas al medir la concentración de la muestra.

SA = La cantidad de material de la muestra medida.

$RF_i$  = El factor de respuesta del componente i determinado por la calibración.

$\text{Área}_i$  = El área del pico del componente i en la corrida del análisis.

$RF_{is}$  = El factor de respuesta del estándar interno es = 1, por definición.

$\text{Área}_{is}$  = El área del pico del estándar interno en la corrida de análisis.

XF = Un factor a escala (multiplicador) que puede ser utilizado como factor de conversión. Si se decide que la  $\text{Conc}_i$  se exprese en porcentaje, XF debe ser igual a 100; de otra manera, su uso es opcional.

(Manual de Operaciones del Integrador Varian 4270, 1983).

### 3.1.5. Determinación del contenido de ETOH de los tejidos vegetales

Se colocaron 10 gramos de tejido rebanado de cada una de las tres réplicas en 10 mL de solución 3 M de NaCl y 10 mL de n-propanol bajo las condiciones ambientales anteriormente señaladas. Las muestras fueron homogeneizadas durante 15 segundos mediante un homogeneizador de tejidos Tekmar Tissumizer<sup>®</sup>, se sellaron como se describió previamente y se colocaron en un baño María a 30°C durante 15 minutos antes al análisis cromatográfico. Al cabo de este lapso se tomaron 0.3 mL del gas del espacio de cabeza y se inyectaron en el cromatógrafo de gases bajo las condiciones mencionadas arriba. Se utilizó un estándar de 10 $\mu$ L/L de la mezcla antes mencionada para la calibración del integrador Varian<sup>®</sup> 4270 comparándolo con los valores del factor de respuesta de estos estándares con las curvas estándar. Se reportan los resultados en  $\mu$ L/L de ETOH.

### 3.2. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES, pH Y ACIDEZ

#### TOTAL TITULABLE DE LOS TEJIDOS VEGETALES

Para los propósitos de este estudio se obtuvieron 13 ejemplares de productos hortofrutícolas provenientes de la Central de Abastos del D.F.: durazno, fresa, kiwi, limón, manzana, naranja, plátano, toronja, tuna, betabel, jitomate, pepino y zanahoria, -por su diferente patrón de respuesta al almacenamiento en CO<sub>2</sub> respecto a la acumulación de ETOH observada en los experimentos de acumulación de este compuesto y a su disponibilidad en la temporada en la que se realizaron las mediciones-. Los productos fueron lavados con agua y jabón, secados imitando a las labores de empacadora comercial. En el caso del experimento con CO<sub>2</sub> se colocaron 3 ó 4 productos (según el tamaño de los mismos), en el caso de fresa se colocaron 8-10 ejemplares en cada contenedor con capacidad de 4.5 L con entradas conectadas a un tubo dosificador de gases en un sistema abierto que proporcionaba una atmósfera de 30% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire, como se describió anteriormente. En el caso de los testigos se colocó la misma cantidad de productos en recipientes de 4.5 L de capacidad a los que se les hizo pasar un flujo de aire de composición igual a la de la atmósfera. La velocidad del flujo que pasaba a través de dichas cámaras fue de aproximadamente 100 mL/min. Todos los contenedores se mantuvieron a 7±1°C, 80% H.R. en el caso del durazno, la fresa, el kiwi, la manzana, la naranja, la toronja, el betabel y la zanahoria y a 10±1°C, 80% H.R. en el caso del limón, el

plátano, la tuna, el jitomate, y el pepino. Los ejemplares asignados al almacenamiento en aire se colocaron en recipientes herméticos a los cuales se les hizo pasar un flujo de aire continuo y se almacenaron también a las temperaturas antes mencionadas en cada caso. Se usaron al menos tres repeticiones para cada observación del tratamiento. Se realizaron muestreos a la llegada de los productos al laboratorio y a las 24 y 48 horas de almacenaje de los mismos para las determinaciones de: pH, acidez titulable y sólidos solubles totales en los 13 diversos productos hortofrutícolas seleccionados; se determinaron algunos ácidos orgánicos del Ciclo de Krebs en kiwi y pepino como ejemplos de productos que respondieron de diferente manera al almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>. Los experimentos se corrieron 3 veces en cada caso.

### 3.3. Determinación de pH y acidez total titulable en homogeneizados de tejidos vegetales

Se homogeneizaron 100 g de tejido vegetal de 13 diferentes productos hortofrutícolas en agua destilada desionizada. Se determinó el pH mediante un potenciómetro (tres repeticiones). Se tomaron alícuotas de 10 mL y se procedió a titularlas con una solución de NaOH 0.1 N hasta un pH de 8.25 (determinado mediante el potenciómetro). Bajo estas condiciones, los ácidos orgánicos y sólo una parte del ácido fosfórico y de los compuestos fenólicos están involucrados en el resultado final. Se reportan los valores de la titulación en miliequivalentes (meq.) de ácidos por gramo de tejido vegetal, o mililitro de jugo (Ulrich, 1970).

#### 3.4. Determinación de °Brix

Se tomó una gota de jugo del producto bajo estudio y se colocó en la celda de un refractómetro manual. Dicha medición se realizó por triplicado. Se reporta el promedio como valor de cada medición en % de °Brix.

3.5. Aproximación organoléptica.- La mitad de las muestras se daba a probar a 3 personas de la comunidad universitaria, no entrenadas y se les pedía que especificaran si se presentaban cambios en el sabor de las mismas. En caso de haberlos se les pedía que explicaran cómo eran éstos, lo cual representó una opinión de tipo sensorial sobre los resultados de los parámetros físicos, químicos y fisiológicos obtenidos en el presente estudio.

A pesar de que, por la capacidad de los contenedores, se contó únicamente con tamaños pequeños de muestras se consideró importante al menos tener una opinión organoléptica sobre si el almacenamiento de los productos en CO<sub>2</sub> podía presentar algún cambio detectable en el sabor de los frutos adicional a los resultados de los parámetros físicos, químicos y fisiológicos. Debido a la diversidad de productos, y a otros factores, no fue posible organizar un panel entrenado de jueces por lo que se recurrió a la llamada Teoría de Pequeñas Muestras o Estadística No Paramétrica (O'Mahony, 1988; Siegel y Castellan 1998). Esta rama de la estadística consta de una serie de técnicas que presentan una alternativa válida a las pruebas tradicionales (paramétricas) pero que son usadas cuando no es posible tener el tamaño de muestra que garantice la aproximación a la Distribución Normal (Siegel y Castellan, 1995; Daniel, 2001).

Estas técnicas estadísticas son recomendadas para estudios sensoriales (O'Mahony, 1988) en los que, como en el presente estudio, no es posible contar con números amplios de jueces o la precisión de los mismos no es muy alta. Las pruebas no paramétricas pueden ser aplicadas con tamaños de muestra tan bajos como  $n=3$  (O'Mahony, 1988; Siegel y Castellan, 1995)

### 3.6. Determinación de ácidos orgánicos que participan en el ciclo de Krebs de tejidos vegetales mediante HPLC

Se prepararon los productos hortofrutícolas de la misma manera mencionada con anterioridad. Se trabajó con pepino y kiwi proveniente de Chile, ambos adquiridos en la Central de Abasto del D.F. Posteriormente se trabajó con kiwi proveniente de Nueva Zelanda debido al cambio de temporada de producción del mismo. Para este propósito particular se cambió el betabel por el kiwi debido a que el pigmento del primero interfirió con la lectura del detector y no se pudieron obtener resultados por la técnica de HPLC.

Para la determinación de la concentración de los ácidos orgánicos de interés en las muestras se realizó una curva estándar de los ácidos orgánicos del Ciclo de Krebs. Se elaboraron 4 mezclas de estándares de los ácidos orgánicos cuyos antecedentes fueron mencionados (Merck<sup>®</sup>, grado cromatográfico) a evaluar, los cuales se describen a continuación por orden de aparición en el cromatograma (ver ejemplo en el apéndice I):

Tabla 1. Estándares utilizados para la medición de algunos ácidos orgánicos que participan en el Ciclo de Krebs

<b>ÁCIDO</b>	<b>MEZCLA I</b>	<b>MEZCLA II</b>	<b>MEZCLA III</b>	<b>MEZCLA IV</b>
CÍTRICO (PM: 192.12)	0.0075% (3.9µmoles/L)	0.05% (26µmoles/L)	0.075% (39µmoles/L)	0.08% (41µmoles/L)
PIRÚVICO (PM: 110)	0.0075% (6.8µmoles/L)	0.05% (45.45µmoles/L)	0.075% (68.18µmoles/L)	0.08% (72.72µmoles/L)
MÁLICO (PM: 134.1)	0.05% (37.28µmoles/L)	0.10% (74.57µmoles/L)	0.15% (111.85µmoles/L)	0.20% (149.14µmoles/L)
SUCCÍNICO (PM: 118.1)	0.15% (127µmoles/L)	0.20% (169.35µmoles/L)	0.25% (211.69µmoles/L)	0.30% (254µmoles/L)

PM = Peso Molecular (g)

Los estándares se prepararon en fase móvil  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.01N, con un pH de 2.7 filtrada y desgasificada. Para la columna utilizada se sugiere no usar fases móviles que contengan cationes diferentes del  $\text{H}^+$  ya que éstas dañan la columna. Los ácidos que contienen haluros, como el HCl no se recomiendan debido al efecto corrosivo sobre el acero inoxidable.

Para la extracción de las muestras se obtuvieron 20 mL del jugo de las mismas, se colocó el vaso de precipitados colector en una charola con hielo para mantener la muestra fría y evitar así cualquier pérdida o deterioro del contenido de ácidos orgánicos de la misma (según el método de Wang (1992) modificado), se

homogeneizaron con 80 mL de fase móvil constituida por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.01N durante un minuto mediante un homogeneizador de tejidos debido a que se debe considerar, no sólo la absorbancia de los componentes de las muestras, sino también el “fondo” o medio (solvente) que funciona como fase móvil en el que éstas están diluidas. Cuando se desarrolla un método cromatográfico se necesita balancear la necesidad de un sistema de solventes que proporcione una resolución adecuada de los componentes de la muestra, con la necesidad de parámetros del detector que proporcionen buena sensibilidad y una absorbancia del medio utilizado como solvente (Roberts *et al.*, 1994). Así, después de realizar algunas observaciones, resultó que las muestras diluidas en fase móvil mostraban una mejor resolución en los picos obtenidos en los cromatogramas que aquéllas disueltas únicamente en agua grado HPLC. Además, se sugiere que la muestra sea desproteínizada antes de su ingreso a la columna, por lo que, al ser extraída con dicha fase móvil, se considera que se ha llevado a cabo la desproteínización de la misma, ya que, tanto el pepino como el kiwi, tienen muy pocas proteínas (0.6 g y 1.0 g respectivamente según Senser y Scherz, 1991). Se filtró la muestra homogeneizada con gasa, se añadieron 20 mL de la fase móvil para lavar el pastel de filtrado, se procedió a centrifugar la muestra en una centrifuga refrigerada Beckman, modelo JM-C1, con el rotor con capacidad de 20 000 rpm, a una velocidad de 15000 rpm (27 200 X g's), a una temperatura de 4°C, durante 15 minutos en el caso del pepino y durante 20 minutos en el caso del kiwi para separar, por precipitación, los cloroplastos y obtener, así, una muestra transparente. El sobrenadante de la muestra se filtró en papel Watman #1. Posteriormente se procedió a diluir la muestra de kiwi (1:9) (v/v) con fase móvil,

debido a que la lectura de los ácidos cítrico y pirúvico era muy alta en la muestra a la llegada al laboratorio, en el caso del kiwi almacenado por 24 horas y en las muestras de pepino no hubo necesidad de realizar dicha dilución. Se filtraron las muestras a través de una membrana LCR, de politetrafluoruro de etileno hidrofiliado con poros de 0.45  $\mu\text{m}$ , compatible con todos los disolventes habituales en HPLC (Millipore<sup>®</sup>, 2000-2001) y se colocaron en pequeños frascos de 2 mL para su posterior lectura mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), en la cual la fase móvil es una solución acuosa o solvente orgánico y los compuestos de la muestra están en estado de disolución, en el HPLC Hewlett Packard en condiciones isocráticas, es decir, la composición del solvente permaneció constante a través de todo el análisis. Éste es el tipo más simple de análisis mediante la técnica de HPLC y es el único tipo posible con ciertos tipos de bomba (Huber, 2005). Las bombas utilizadas en HPLC se basan en un pistón recíprocante que desplaza un volumen fijo de solvente por unidad de tiempo. Al ajustar la velocidad del motor con respecto al ciclo de la bomba, se pueden obtener flujos sin pulsaciones (Kirk, *et al.*, 2000). Este método es una modificación de aquel reportado por Wang (1992), cuya prueba de recuperación resultó en un 99.8% para el ácido málico y 98.2% para el ácido cítrico. Se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra en el cromatógrafo para lograr una máxima eficiencia en la separación de los ácidos (con cantidades muy grandes se ensanchan los picos o se enciman unos con otros) y se utilizó el fotodetector de arreglo de diodos (PDA) (Fig. 10), el cual traduce los cambios de concentración (en este caso) de los ácidos orgánicos de las muestras que se encuentran en el fluido de la fase móvil, en señales eléctricas,

cambiando rápidamente los espectros de absorbancia (UV y UV-Visible) para las sustancias que se eluyen (Kirk, *et al.*, 2000). Dicho detector es muy sensible a las moléculas orgánicas que absorben la luz dentro de las longitudes de onda visibles o en el rango del ultravioleta, los cuales incluyen a muchos compuestos. Es un detector estable encunado, se varían las condiciones cromatográficas y tiene un muy buen rango de trabajo lineal, abarcando, típicamente, 3 órdenes de magnitud en la concentración de la muestra. Este detector registra toda la información espectroquímica de las muestras pues mide la absorbancia a través de un amplio espectro de longitudes de onda simultáneamente, lo cual tiene enormes ventajas sobre otros detectores tipo UV-Vis que sólo permiten la medición a través de una sola longitud de onda seleccionada en cualquier punto del cromatograma. Se mide la absorción de la radiación en el rango de longitudes de onda variables, entre 190 y 800 nm de acuerdo con la ley de Beer, la cual establece que, en la región visible del espectro electromagnético, ciertas longitudes de onda se absorben y otras son reflejadas por un objeto. El rango de longitudes de onda reflejadas es el color que se puede ver. A medida que se intensifica el color, menor cantidad de luz pasa a través de una solución. Éste fue el problema que se tuvo al intentar determinar los ácidos orgánicos contenidos en el betabel. A medida que la luz pasa a través de una senda más larga de la solución, hay también menos luz transmitida. La ecuación de la ley de Beer es la siguiente:

$$A = -\log T = abc$$

En donde:

$$A = \text{Absorbancia}$$

T = Transmitancia

a = Constante de absortividad para la reacción  $\text{cm}^{-1} \text{g}^{-1} \text{L}^{-1}$

b = La longitud de la senda óptica, en cm

c = Concentración en g/L

(Galensa, 1993; Rounds and Gregory, 1994; Skoog y Leary, 1996).



Fig. 10.- Fotodetector de arreglo de diódos (PDA)

Con la habilidad de cuantificar la luz transmitida a través de la solución o la luz absorbida por una solución, es posible determinar concentraciones de sustancias reactivas.

Se utilizó una columna especial para medir los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs (Alltech (IOA-1000), con número de catálogo 9646), empacada con un material polimérico de intercambio de cationes en la forma de hidrógeno iónico. La columna midió 300 X 7.8 mm en su interior y sus dimensiones externas eran: 3/8 in. O.D X 335 mm. Dicha columna necesita sólo una fase móvil que contenga ácido diluido, en este caso se aconsejó en el manual de dicha columna el  $\text{H}_2\text{SO}_4$

0.01N a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min., a una presión de 95 atm. (1425 psi), para la obtención de una mejor resolución de picos en el cromatograma. El mecanismo principal de separación de los ácidos es por exclusión iónica. Cabe hacer notar que se necesitaron un horno para elevar la temperatura a 25°C y un filtro de precolumna, así como un prefiltro de acero inoxidable revestido que tiene como función ayudar a reducir el ruido, eliminar bacterias potencialmente presentes y limpiar el sistema (Huber, 2005), localizado en la válvula de recepción de la muestra, antes de la columna, cuya función es retener cualquier contaminante que pudiera haberse pasado aún después de filtrar a través de la membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . La normalidad del ácido sulfúrico fue sugerida por el manual de la columna utilizada. Debido a que la protonación de un grupo funcional depende de su valor de pKa, la selección del pH del eluyente es crítica para asegurar la ionización completa de las sustancias que se van a medir. También se utilizó una guarda para la columna para evitar contaminaciones de las muestras y la fase móvil que provocarían la generación de presiones excesivas en el aparato. Los contaminantes como las sales y las proteínas pueden alterar el funcionamiento de la columna.

Los resultados se reportan en valores de F, en  $\mu\text{moles/L}$  del ácido orgánico en cuestión.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cumplir con los propósitos estadísticos, para las determinaciones de acumulación de ETOH en los diversos productos hortofrutícolas bajo estudio, se consideró cada producto en el contenido de cada cámara como una unidad experimental, a menos que éste fuera tan pequeño que se tuvieran que unir dos o tres frutos en una unidad experimental (*i.e.*, el caso de la fresa y la uva). Se utilizó la técnica de submuestreo para proporcionar al menos tres réplicas para cada producto en cada día de evaluación. Se calcularon las estadísticas descriptivas para cada uno de estos grupos, tales como la media y el error estándar, para cada uno de dichos grupos.

Posteriormente se realizó una serie de regresiones usando el tiempo como variable explicativa para determinar las **tendencias** de acumulación de ETOH en los diversos productos hortofrutícolas bajo estudio (MS Excell<sup>®</sup>).

El principal problema en cuanto a la prueba de la existencia de los modelos de producción de ETOH es poder distinguir entre ellos, ya que, como se planteó en la introducción, cada uno de los productos hortofrutícolas reaccionará en forma diferente, lo cual, aún dentro de una tendencia general, puede presentar variación en función del estado de madurez, la variedad, la época de cosecha, etc. Debido a esta diversidad en las fuentes de variación del problema se decidió utilizar el criterio de mejor aproximación a los modelos. De esta forma el modelo de

acumulación lenta puede ser representado matemáticamente por una ecuación cuadrática del tipo  $y = +ax^2+bx+c$ , en la que el coeficiente del término cuadrático será positivo; el modelo de acumulación rápida estará matemáticamente representado por una ecuación igualmente cuadrática pero con el coeficiente negativo, indicando una declinación en la tasa de acumulación del ETOH aproximadamente después de un período de 24 horas de almacenamiento. Finalmente, el modelo de acumulación gradual será representado matemáticamente por ecuaciones lineales del tipo  $y=ax+b$ . En esta tesis se utilizó el criterio de mejor aproximación a cualquiera de estos modelos para determinar si el patrón de acumulación de ETOH exhibido por los productos estudiados podía ser asignado a uno u otro de los patrones. Se selecciono el progama NCSS (Hintz, 2003) como en el que se probaran simultáneamente los tres modelos para cada conjunto de datos, es decir, para cada producto en cada tratamiento experimental (aire, como testigo o aire+CO<sub>2</sub>) asignando al modelo adecuado aquella ecuación que presentara el índice de determinación ( $r^2$ ) con mayor valor absoluto. Cabe aclarar que no se buscaba un ajuste óptimo a los modelos, por lo que, en algunos casos, el “mayor valor absoluto” resultó ser muy pequeño. Sin embargo, esto se verificó haciendo un análisis para determinar la pertenencia de los modelos a la “familia de curvas”. El análisis de “Familia de Curvas” se basa en la diferencia en el cuadrado medio del error (CME) de cada modelo y el del grupo de curvas, es decir, que si el CME (interpretado como la varianza no explicada por la regresión) de un modelo en particular dividido entre el CME de la familia completa tiene una F no significativa, el modelo puede ser considerado como perteneciente a dicha familia de curvas (Draper y Smith, 1981).

En el caso de los experimentos de doble control se realizó un análisis de covarianza para probar la igualdad de pendientes. Si las pendientes eran iguales la tasa de acumulación de ETOH sería igual. Para cumplir con este propósito se corrió una prueba de análisis de covarianza siguiendo la sugerencia del programa NCSS (Hintze, 2004). De esta manera se pretendió verificar si la sensibilidad al daño por frío influía sobre el patrón de acumulación de ETOH, de los productos hortofrutícolas que lo manifestaran, al ser almacenados a temperaturas más bajas que las recomendadas para su almacenamiento.

Para cumplir con los propósitos estadísticos en las determinaciones de pH, acidez total titulable y los ácidos orgánicos del Ciclo de Krebs, se consideró cada producto en el contenido de cada cámara como una unidad experimental (excepto en el caso de los frutos pequeños, en los que la unidad experimental era de cada 100 g, como fueron los casos de la fresa y la uva). Se utilizó la técnica de submuestreo para proporcionar al menos tres réplicas para cada producto en cada día de evaluación, como se indicó anteriormente. En el caso de las determinaciones para el análisis de las opiniones sensoriales se utilizó la estadística no paramétrica, ya que los datos obtenidos no presentaban una distribución normal. Así, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, la cual se utiliza cuando se ha logrado por lo menos, una medida ordinal y la población muestreada es muy pequeña. Puede usarse para probar si dos grupos independientes han sido tomados de la misma población. Ésta es una de las pruebas no paramétricas

más poderosas y constituye la alternativa más útil ante la prueba paramétrica t (O'Mahony, 1988; Siegel y Castellan, 1998) (SAS, 2005).

En los demás análisis se calcularon las estadísticas descriptivas para cada una de las variables consideradas, tales como la media y el error estándar para cada uno de ellos así como un análisis de varianza y una prueba t apareada para comparar las diferencias existentes entre los productos tratados y no tratados con 30% de CO<sub>2</sub>, por cada día de almacenamiento, para evitar confusiones o errores debidos al factor tiempo cuando se toman en cuenta las muestras independientes. De esta manera la hipótesis nula es:  $H_0 = \bar{X}_{d} = 0$  en donde  $\bar{X}_{d}$  representa a la media de cada par de datos tratados y no tratados con 30% de CO<sub>2</sub> por día de almacenamiento. Todos estos análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso del paquete estadístico NCSS (Hintze, 2004).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Acumulación de ETOH

La estadística que proporcionó mayor información para el cumplimiento de los objetivos de categorización de grupos de modelos, aquí planteados, fueron las regresiones (ver ejemplos en las figuras 11 a 15).

Los patrones de acumulación de ETOH en diversos productos hortofrutícolas en respuesta al almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, comparados con aquellos proporcionados por los almacenados con aire, se muestran en la Tabla 2.

Los resultados obtenidos a partir de estas regresiones pueden organizarse en 5 grupos:

Grupo 1.- Aquéllos productos en los que el almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> **NO** produjo un cambio significativo en el **patrón** de acumulación de ETOH (independientemente de que pudo haber diferencias significativas en la cantidad de ETOH total acumulado). Así, el primer grupo está representado por aquéllos productos que presentaron tendencias lineales en ambos casos y lo componen: la ciruela, la fresa, la pitaya y el pepino (Fig. 11).

Patrones de acumulación de ETOH bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Las gráficas aparecen ordenadas presentando primero las que son frutas y luego hortalizas, y dentro de estos grupos en orden alfabético por el nombre común.

◆ Almacenamiento en Aire, ● Almacenamiento en CO<sub>2</sub>

Fig. 11. Grupo 1. Productos en los que no se presentó diferencia entre las formas de almacenaje, en especies que presentaron acumulación de ETOH en forma lineal

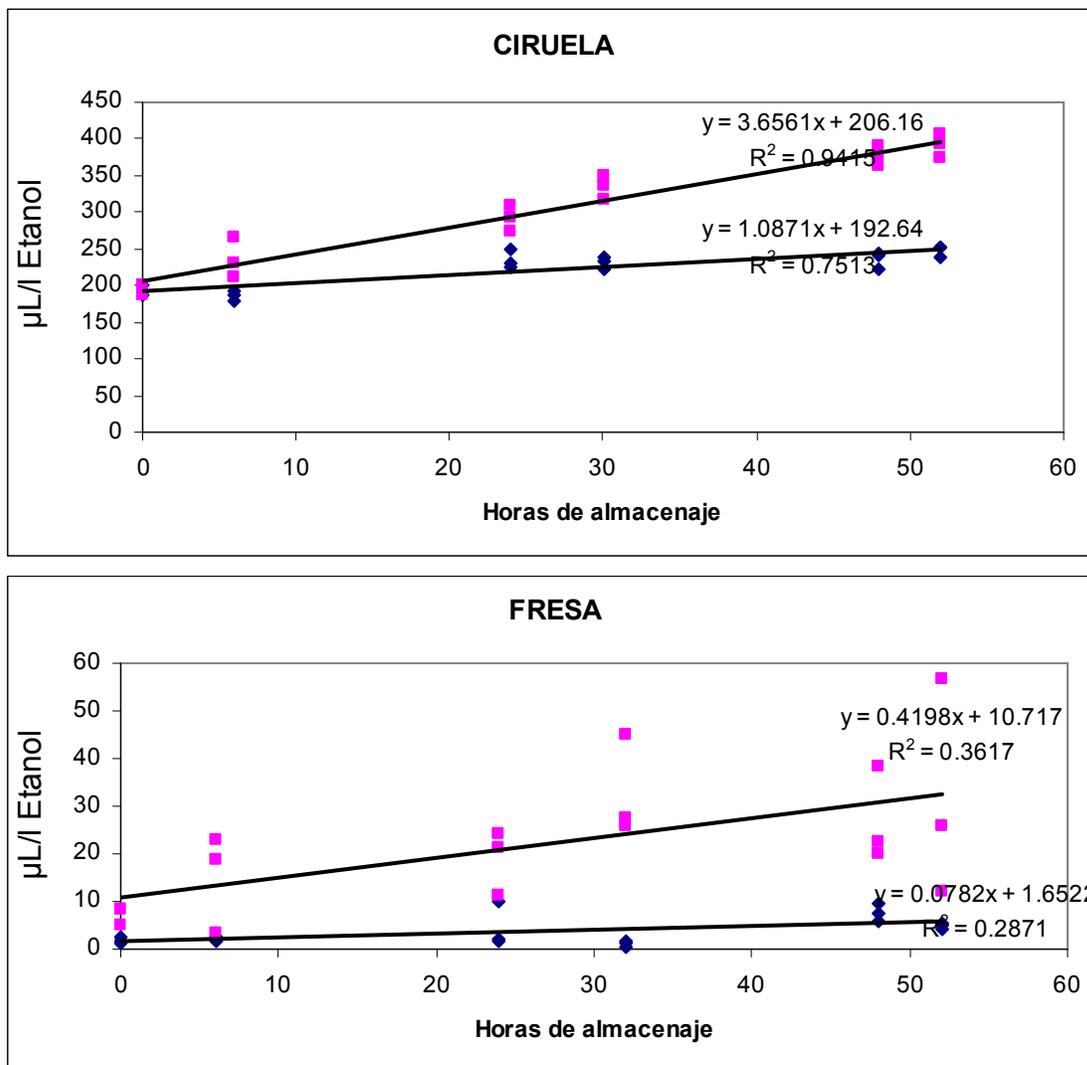
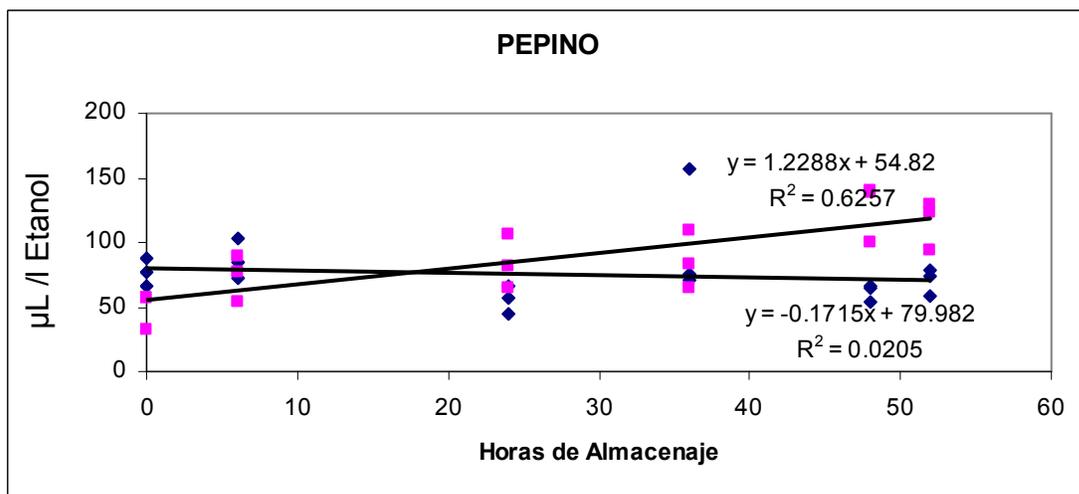
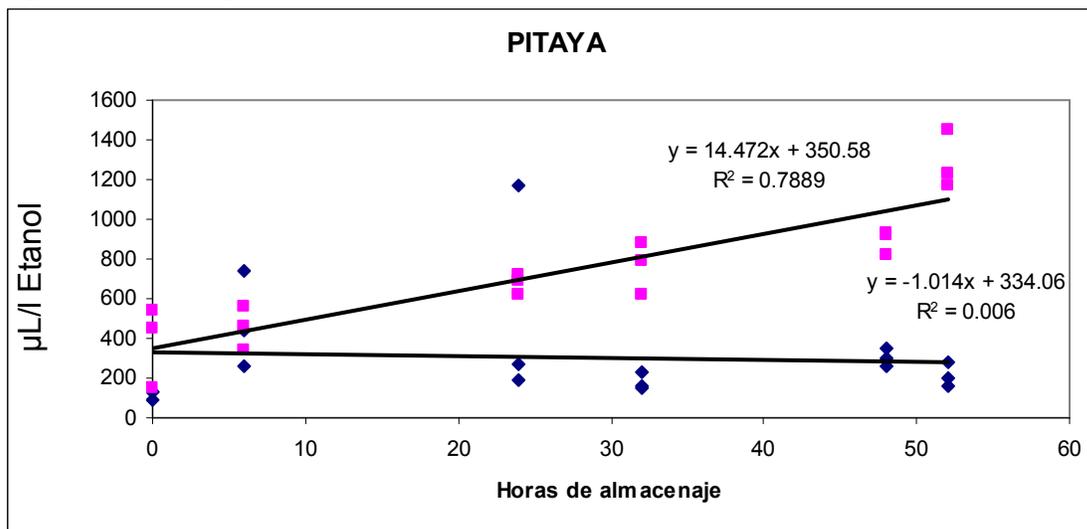


Fig. 11 Cont. Grupo 1



Grupo 2.- Compuesto por aquéllos productos que tampoco sufrieron diferencias significativas en el **patrón** de acumulación de ETOH y cuya acumulación del mismo, al almacenarse en aire **NO presentó un patrón lineal** o presentó un **patrón** representado por una ecuación cuadrática. Entre estos productos se encuentran: la toronja, el brócoli, la col, y la zanahoria, (Fig. 12).

Fig. 12. Grupo 2. Especies en las que no se presentó efecto del CO<sub>2</sub> cuyo patrón de acumulación de etanol fue en forma curva.

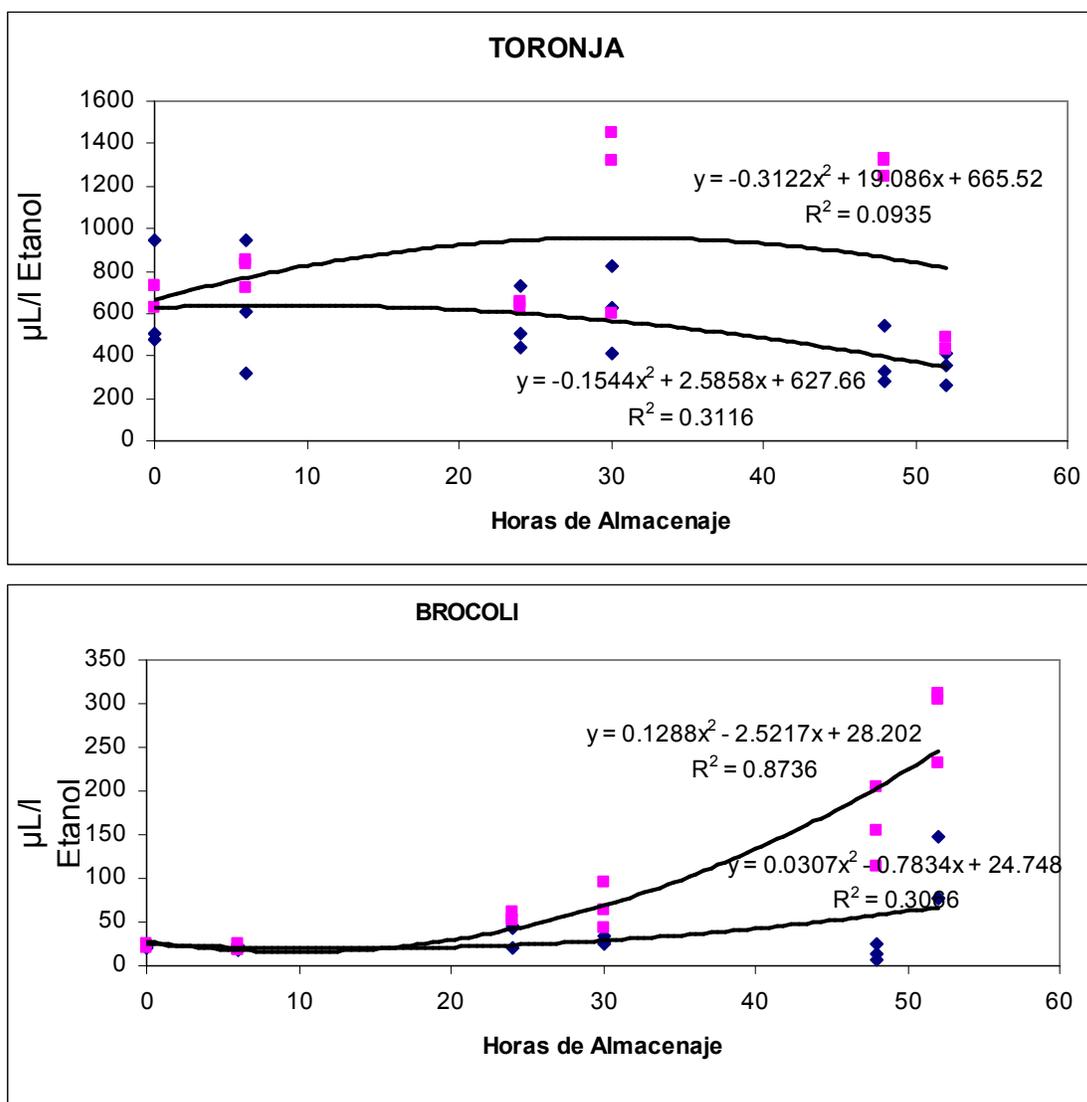
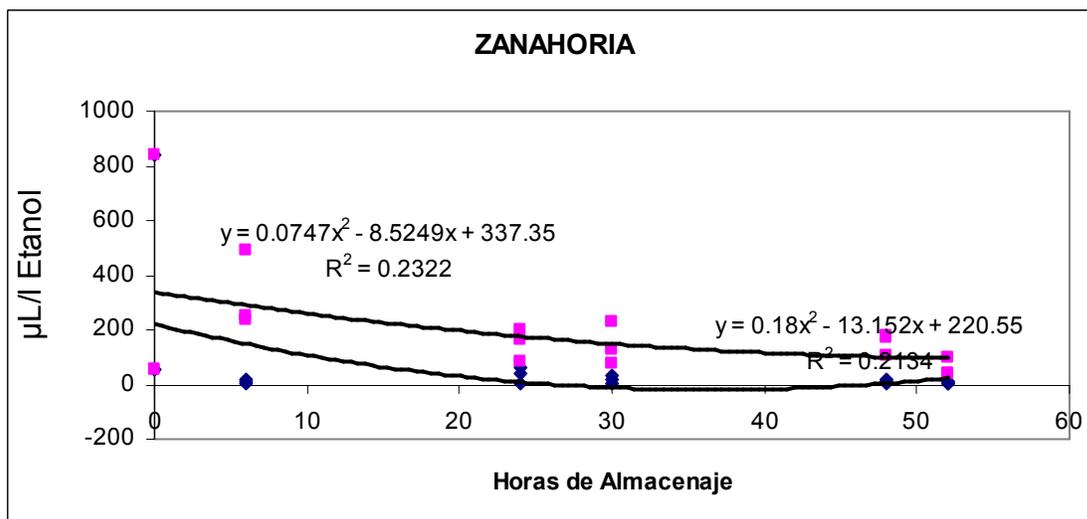
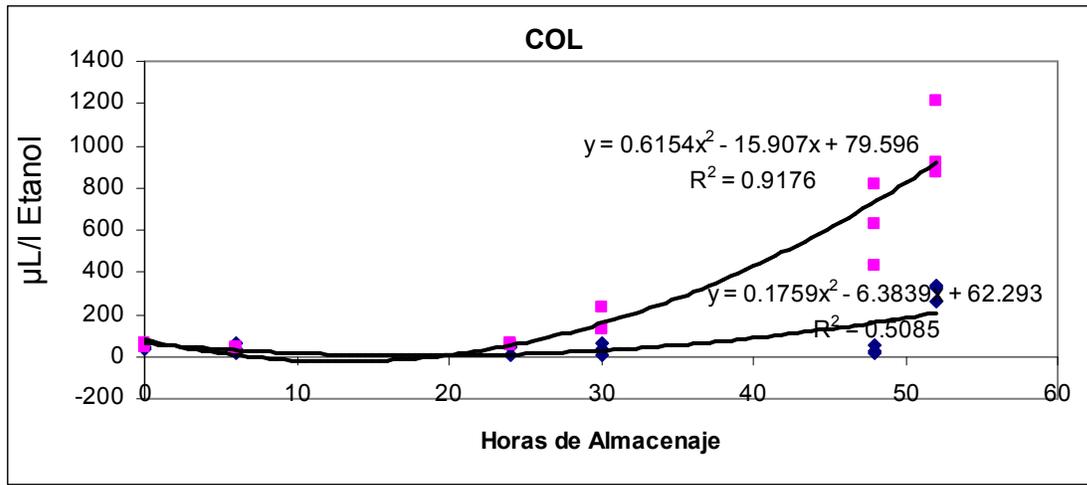


Fig. 12 Cont. Grupo 2



Grupo 3.- Representado por aquellos productos hortofrutícolas en los que el almacenamiento bajo condiciones ricas en CO<sub>2</sub> provocó una modificación en la forma o **patrón** de acumulación de ETOH partiendo de un patrón lineal al almacenarse en aire a un **patrón** cuadrático en el almacenamiento en CO<sub>2</sub>. En dichos productos se produjo un cambio del modelo lineal en condiciones de almacenamiento en aire a un modelo cuadrático positivo en condiciones de almacenamiento en CO<sub>2</sub> (Fig. 13). Se encuentran dentro de este grupo: el durazno, el kiwi, la manzana, el jitomate, la lechuga orejona y la papa.

Fig. 13. Grupo 3. Especies en las que sí se presentó diferencia en el patrón de acumulación de ETOH entre las dos condiciones de almacenaje cuando se presentó un patrón lineal en aire y un patrón curvilíneo positivo en almacenamiento en CO<sub>2</sub>

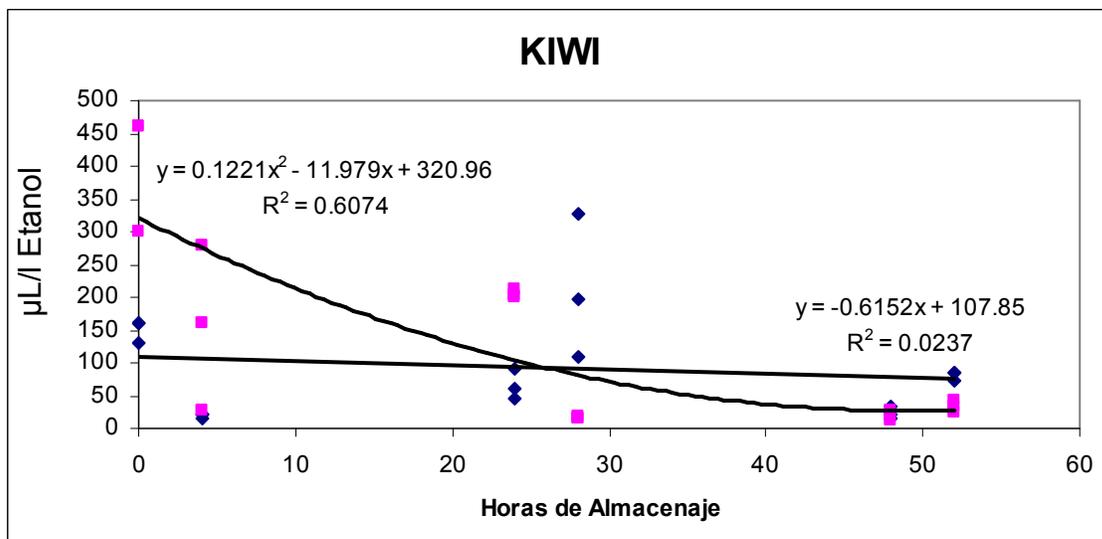
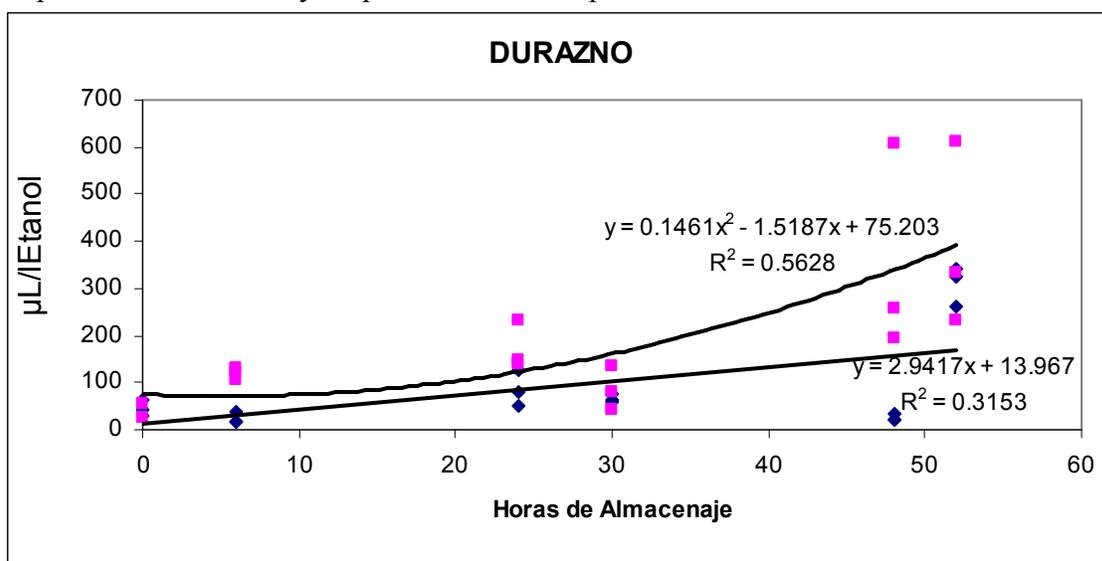


Fig. 13 Cont. Grupo 3

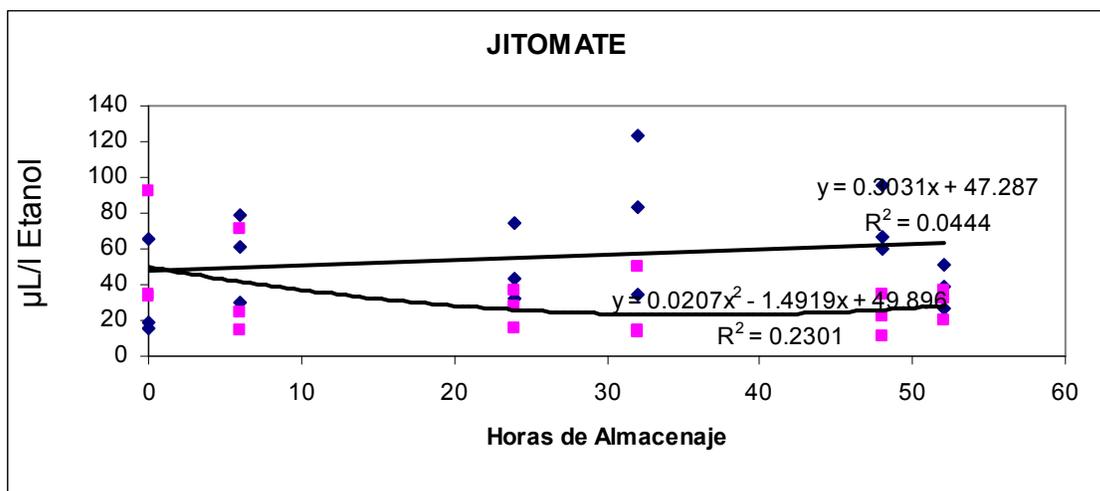
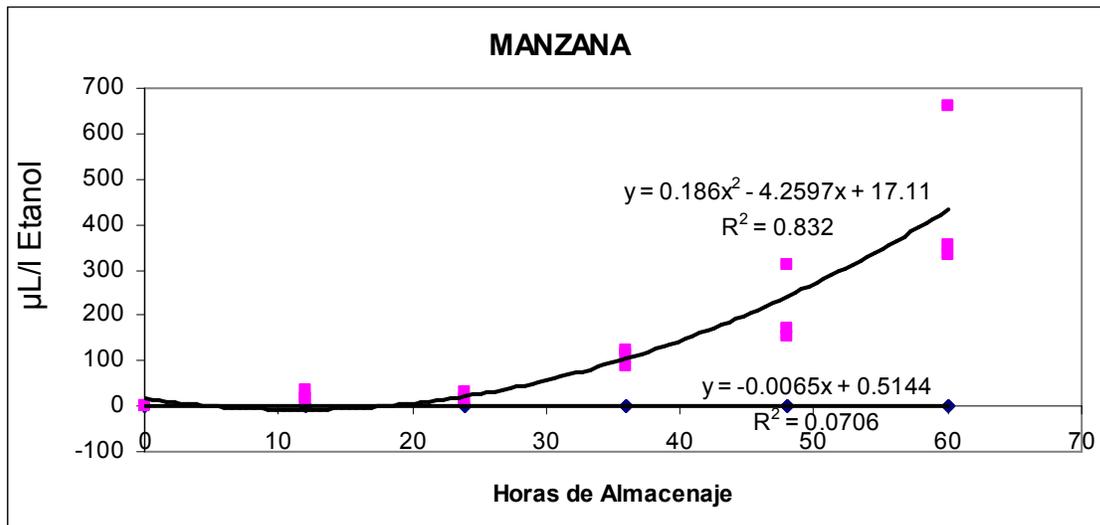
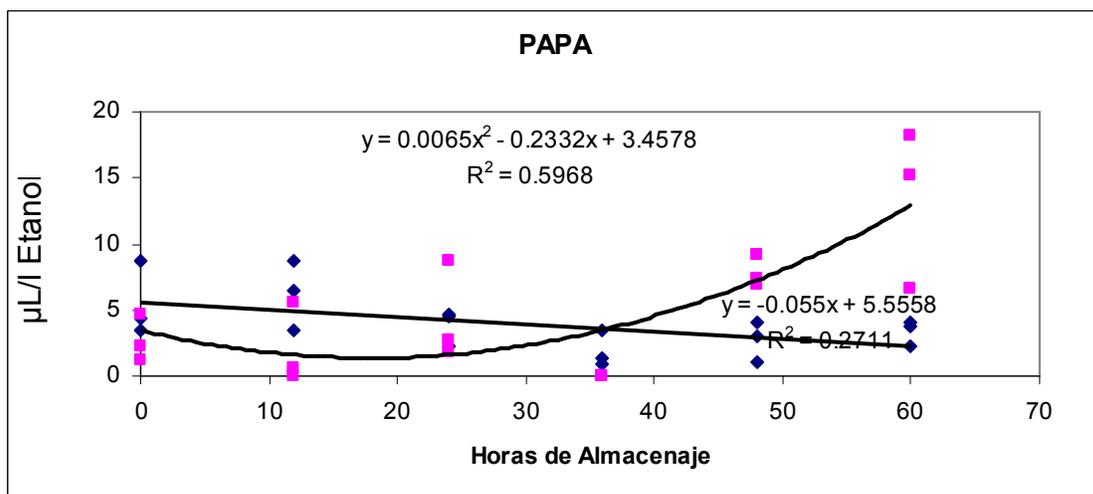
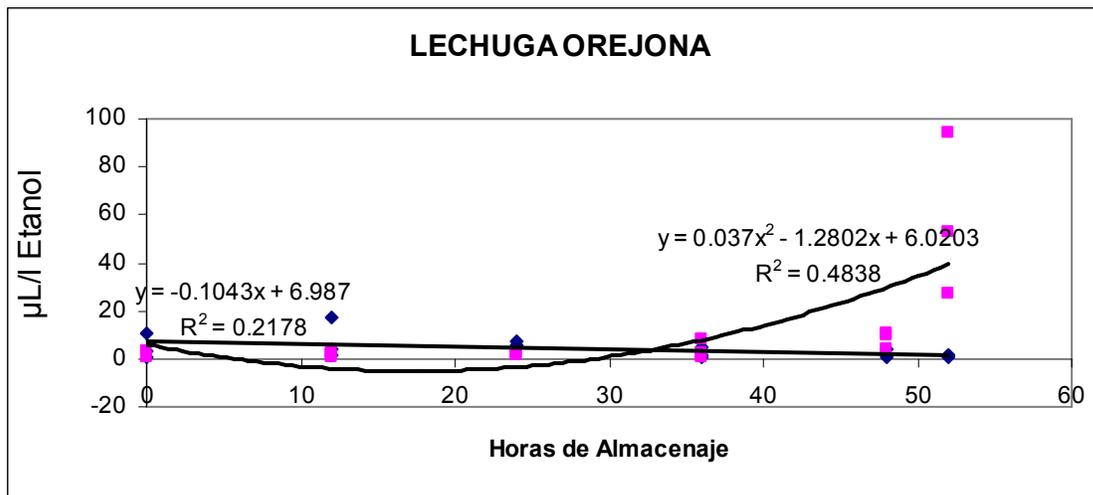


Fig. 13 Cont. Grupo 3



Grupo 4.- Conformado por aquéllos productos en los que el efecto del  $\text{CO}_2$  produjo un cambio a partir de un modelo o **patrón** lineal a un **patrón** cuadrático negativo en la acumulación de ETOH. Estos productos están representados por: la naranja, la tuna cardona, la uva 'Thompson' y el betabel (Fig. 14).

Fig. 14. Grupo 4. Especies en las que sí se presentó diferencia en el patrón de acumulación de ETOH entre las dos condiciones de almacenaje cuando se presentó un patrón lineal en aire y un patrón curvilíneo negativo en almacenamiento en CO<sub>2</sub>.

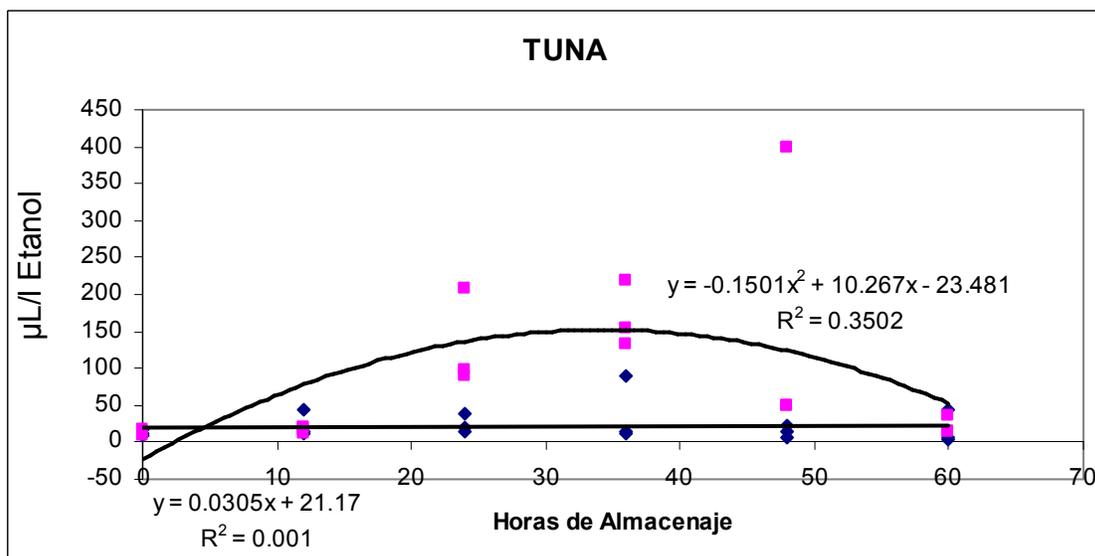
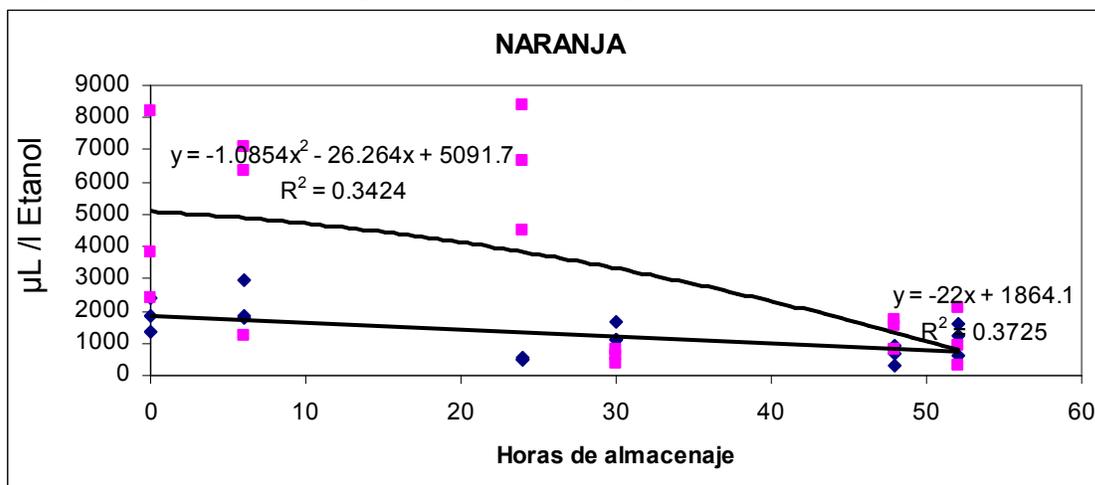
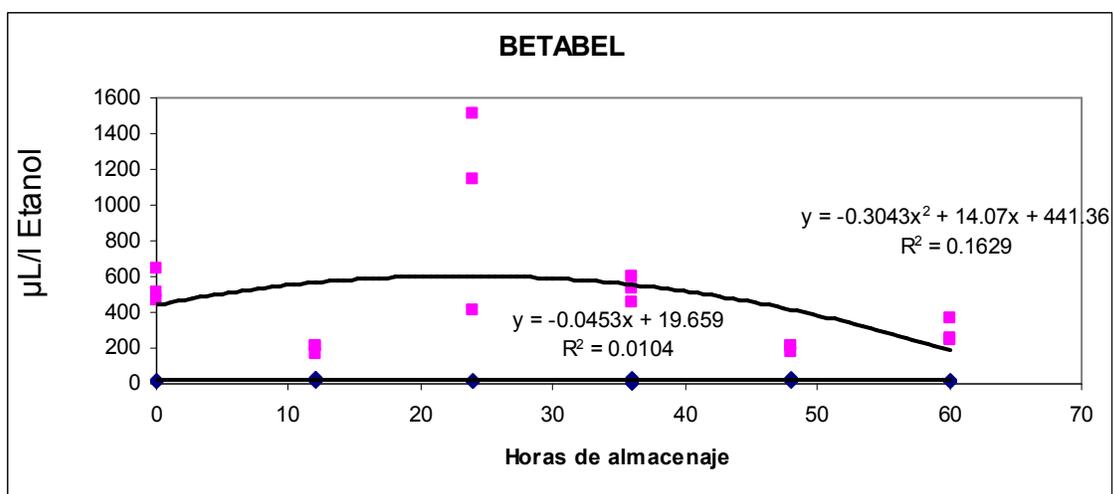
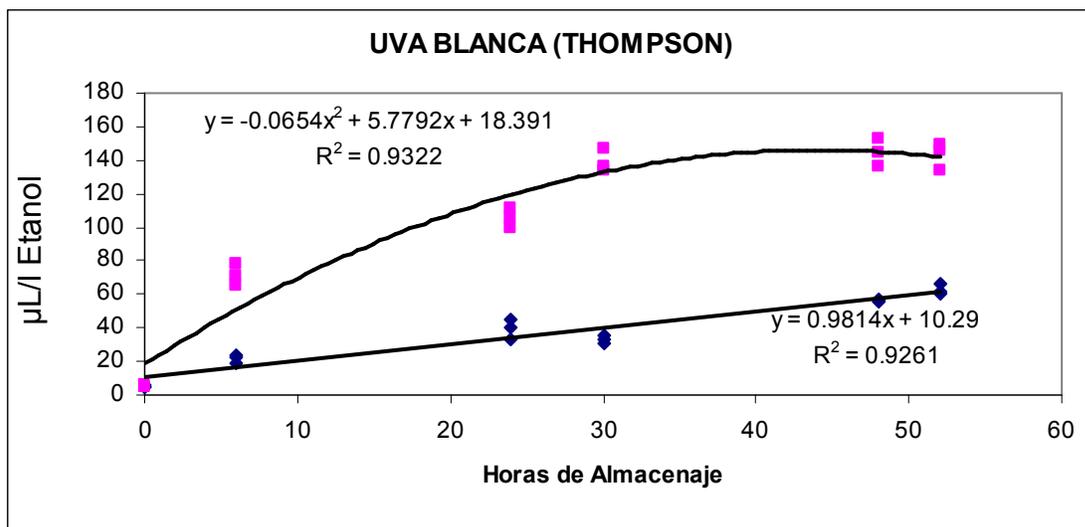


Fig. 14 Cont. Grupo 4



Grupo 5.- Finalmente este grupo está constituido por aquéllos productos que tuvieron una acumulación de ETOH representada por una curva cuadrática negativa en almacenamiento bajo CO<sub>2</sub>. Este grupo está formado por: el limón persa y el plátano tabasco (Fig. 15).

Fig. 15. Grupo 5. Especies en las que sí se presentó diferencia en el patrón de acumulación de ETOH entre las dos condiciones de almacenaje cuando se presentó un patrón curvilíneo en ambas condiciones pero cambió el sentido del patrón.

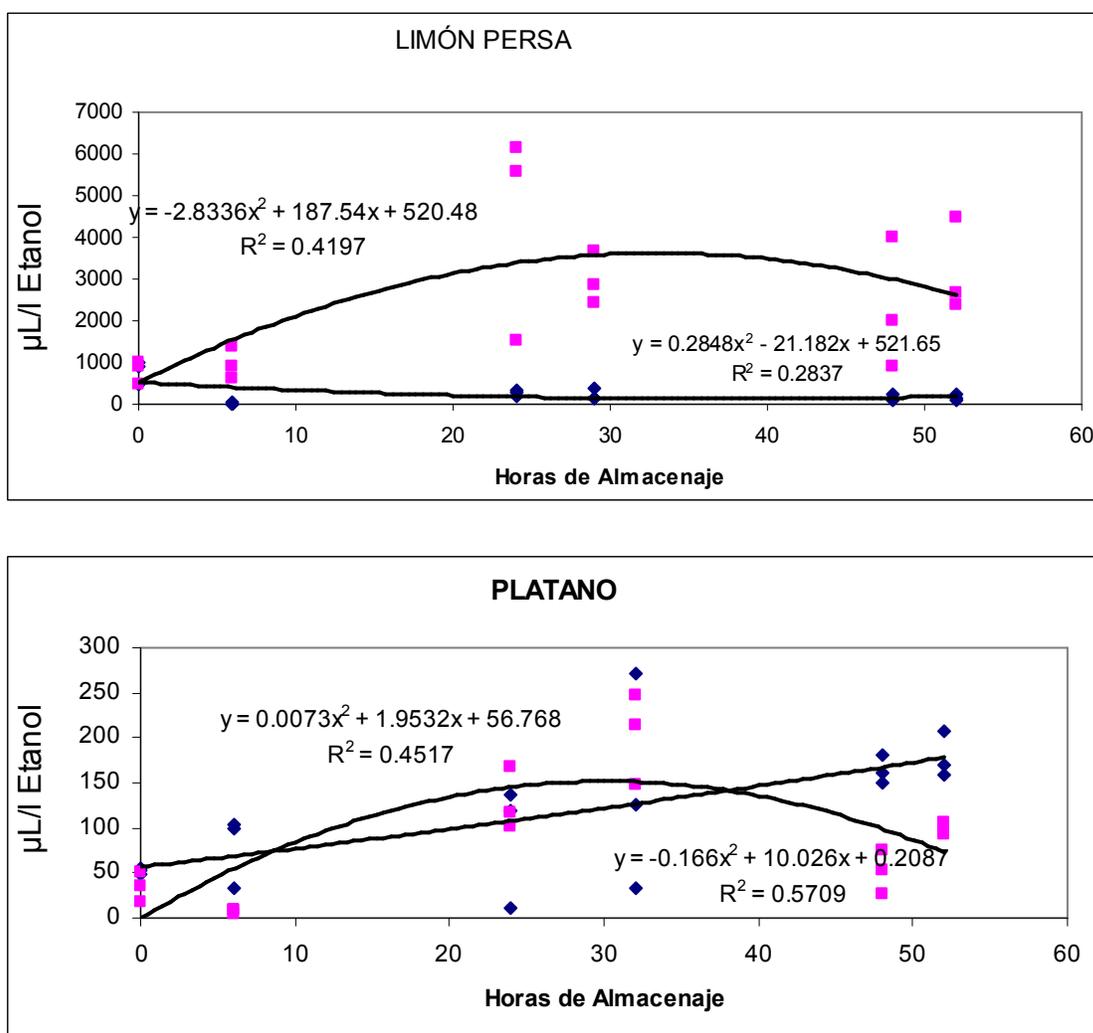


Tabla 2.- Tendencias de acumulación de ETOH durante el almacenamiento en aire y en CO <sub>2</sub> de los productos estudiados. Se presentan las tendencias obtenidas de las regresiones efectuadas detalladamente para cada fruto. (Las regresiones en donde se muestran las concentraciones de ETOH se encuentran descritas en las páginas previas, figs. 11-15).			
PRODUCTO	ALMACENAMIENTO EN AIRE	ALMACENAMIENTO EN CO <sub>2</sub>	
Grupo 1 Frutos en los que no se presentó diferencia entre las formas de almacenaje, en especies que presentaron acumulación de ETOH en forma lineal			
<b>FRUTAS</b>			
1	Ciruela roja ( <i>Prunus domestica</i> , L.) madura	Lineal	Lineal
2	Fresa ( <i>Fragaria X annanasa</i> , Duch.) madura	Lineal	Lineal
3	Pitaya de mayo ( <i>Stenocereus griseus</i> , (Haw.) F. Buxb.) madura	Lineal	Lineal
<b>HORTALIZA</b>			
4	Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> , L.) maduro	Lineal	Lineal
Grupo 2 Especies en las que no se presentó efecto del CO <sub>2</sub> cuyo patrón de acumulación de ETOH fue en forma curva.			
<b>FRUTA</b>			
5	Toronja ( <i>Citrus X paradisi</i> , Macf.) madura	Cuadrática negativa	Cuadrática negativa
<b>HORTALIZAS</b>			
6	Brócoli ( <i>Brassica oleracea</i> , L. grupo Italica)	Cuadrática positiva	Cuadrática positiva
7	Col ( <i>Brassica oleracea</i> , L. grupo Capitata)	Cuadrática positiva	Cuadrática positiva
8	Zanahoria ( <i>Daucus carota</i> , L.)	Cuadrática positiva	Cuadrática positiva
Grupo 3 Especies en las que sí se presentó diferencia en el patrón de acumulación de ETOH entre las dos condiciones de almacenaje cuando se presentó un patrón lineal en aire y un patrón curvilíneo positivo en almacenamiento en CO <sub>2</sub>			
<b>FRUTAS</b>			
9	Durazno ( <i>Prunus persica</i> , L.) maduro	Lineal	Cuadrática positiva
10	Kiwi ( <i>Actinidia deliciosa</i> , Planch.) maduro y senescente	Lineal	Cuadrática positiva
11	Manzana var. Red Delicious ( <i>Malus pumila</i> , Mill.) madura	Lineal	Cuadrática positiva
<b>HORTALIZAS</b>			
12	Lechuga orejona ( <i>Letuca sativa</i> , L.)	Lineal	Cuadrática positiva
13	Papa blanca ( <i>Solanum tuberosum</i> , L.)	Lineal	Cuadrática positiva
14	Jitomate bola ( <i>Licopersicon sculentum</i> , L.) maduro	Lineal	Cuadrática positiva
Grupo 4 Especies en las que sí se presentó diferencia en el patrón de acumulación de ETOH entre las dos condiciones de almacenaje cuando se presentó un patrón lineal en aire y un patrón curvilíneo negativo en almacenamiento en CO <sub>2</sub> .			
<b>FRUTAS</b>			
15	Naranja Valencia ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) madura	Lineal	Cuadrática negativa
16	Tuna cardona ( <i>Opuntia Ficus indica</i> , (L.) Mill.) madura	Lineal	Cuadrática negativa
17	Uva Thompson Seedless ( <i>Vitis vinifera</i> , L.) madura	Lineal	Cuadrática negativa
<b>HORTALIZA</b>			
18	Betabel ( <i>Beta vulgaris</i> , L.)	Lineal	Cuadrática negativa

Grupo 5 Especies en las que sí se presentó diferencia en el patrón de acumulación de ETOH entre las dos condiciones de almacenaje cuando se presentó un patrón curvilíneo en ambas condiciones pero cambió el sentido del patrón.			
<b>FRUTAS</b>			
19	Limón Persa ( <i>Citrus limon</i> Burm. F.) maduro	Cuadrática positiva	Cuadrática negativa
20	Plátano tabasco ( <i>Musa paradisiaca</i> , L.) maduro	Cuadrática positiva	Cuadrática negativa

Se observó, en general, variabilidad entre los diversos productos no sólo en su concentración inicial de ETOH sino también al final de su período de almacenamiento. Así, mientras el betabel y la papa presentaban trazas, la zanahoria presentaba niveles de menos de  $10\mu\text{L/L}$ , el jitomate bola y el plátano tabasco de  $15 - 30\mu\text{L/L}$ , y el pepino de  $50\mu\text{L/L}$ . La respuesta generalmente tuvo una tendencia lineal en los productos estudiados almacenados en aire a excepción del limón, el plátano, el brócoli, la col, y la zanahoria, cuya tendencia fue cuadrática positiva es decir, la acumulación de ETOH tendió a incrementarse gradualmente durante todo el período de almacenamiento. En el caso de los productos que acumulan ETOH en forma cuadrática, al parecer, los tejidos acumulan poco ETOH en los primeros días de exposición al  $\text{CO}_2$  hasta un punto en el que la resistencia de los tejidos a dicho gas llega a su límite máximo o umbral, disparándose, irremediablemente, el proceso de fermentación etanólica. Cabe destacar el caso del limón persa, el plátano tabasco, la toronja y la tuna, cuya tendencia fue cuadrática negativa, es decir, la acumulación de ETOH tendió a estabilizarse hacia el tercer día de almacenamiento.

En el caso particular del plátano tabasco el efecto nocivo del  $\text{CO}_2$  se detectó antes del tercer día de su exposición al mismo. Se notó una coloración grisácea en la piel, así como ruptura de sus tejidos. Después del segundo día de

almacenamiento se encontró, mediante las determinaciones cromatográficas, una aparente disminución en la acumulación de ETOH. Sin embargo, su apariencia estaba muy deteriorada y, obviamente, no se le realizó el análisis sensorial.

Los productos hortofrutícolas verdes almacenados en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> presentaron un realce en su apariencia debido a que exhibieron un color verde brillante, con valores proporcionados por el colorímetro Hunter Lab en un rango de: **L:** 41 a 43 comparados con los almacenados en aire con valores de **L:** 46.5 a 47; **Hue:** 136 a 137.2 en los tratados con CO<sub>2</sub> y **Hue:** 122.9 a 121 en los tratados con aire; **Chroma:** 11 a 15.4 en los tratados con CO<sub>2</sub> y **Chroma:** 17.7 a 21.5 en los tratados con aire, indicativo de que no se había suspendido el proceso fotosintético y, por tanto, continuó la fijación de CO<sub>2</sub> en el caso de los productos almacenados en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, lo cual los hizo lucir más frescos a la vista de las personas que emitieron su opinión sensorial. El aroma desagradable que emanaban recién llevados al laboratorio se eliminaba en unos segundos, de manera que, al ser presentados a las personas que emitieron sus opiniones sensoriales éstos ya no lo detectaban.

Con respecto a su respuesta al almacenamiento en 30% de CO<sub>2</sub> en aire los productos observados han presentado tendencias cuadráticas positivas con excepción de la ciruela roja, la fresa, la pitaya de mayo y el pepino, es decir, el ETOH se acumula en una tendencia lineal como respuesta al almacenamiento en CO<sub>2</sub> y los cítricos al igual que la uva Thompson Seedless, cuya tendencia fue cuadrática negativa. Se observó también en el kiwi variabilidad en su respuesta a la acumulación de ETOH. Once de los 20 productos hortofrutícolas estudiados

presentaron un cambio en su patrón de acumulación de ETOH en respuesta a su almacenamiento en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>.

Se realizaron repeticiones de los experimentos de almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, esta vez en diferentes grados de madurez. Se experimentó con kiwi en madurez de consumo exacto (firme) y kiwi hacia la etapa de la senescencia (suave). Se encontraron diferencias entre ambos estados de madurez en cuanto a la concentración de ETOH acumulada durante el período de almacenamiento en 30% de CO<sub>2</sub> (v/v) pero no en lo que respecta a la tendencia de acumulación de ETOH.

También se realizaron análisis de otros parámetros, tales como: determinaciones de pH y acidez total titulable, así como de sólidos solubles totales. Se efectuó un análisis de componentes principales en el cual se encontró que el pH y la acidez titulable explican la mayor parte de la variación observada en estos parámetros, pero de manera inversa, es decir al aumentar el pH disminuye la acidéz titulable. En este análisis el primer componente principal explicó el 55.67% de la varianza, el segundo 33.34% y el tercero 10.99 %

<b>Tabla 3 Vectores propios (Eigenvectores) de cada uno de los componentes principales</b>			
<b>Variables</b>	<b>Comp. Prin1</b>	<b>Comp. Prin2</b>	<b>Comp. Prin3</b>
pH	0.707179	-0.001958	0.707032
BRIX	-0.072468	0.994529	0.075237
ACTIT	-0.703311	-0.104443	0.703168

Se observó, asimismo, que el peso de los productos estudiados tendió a influir en la respuesta de los mismos a las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>. Aquellos

productos más voluminosos, excepto la papa, tendieron a presentar mayores niveles de ETOH acumulado (Figs. 16 y 17).

## ETOH vs PESO

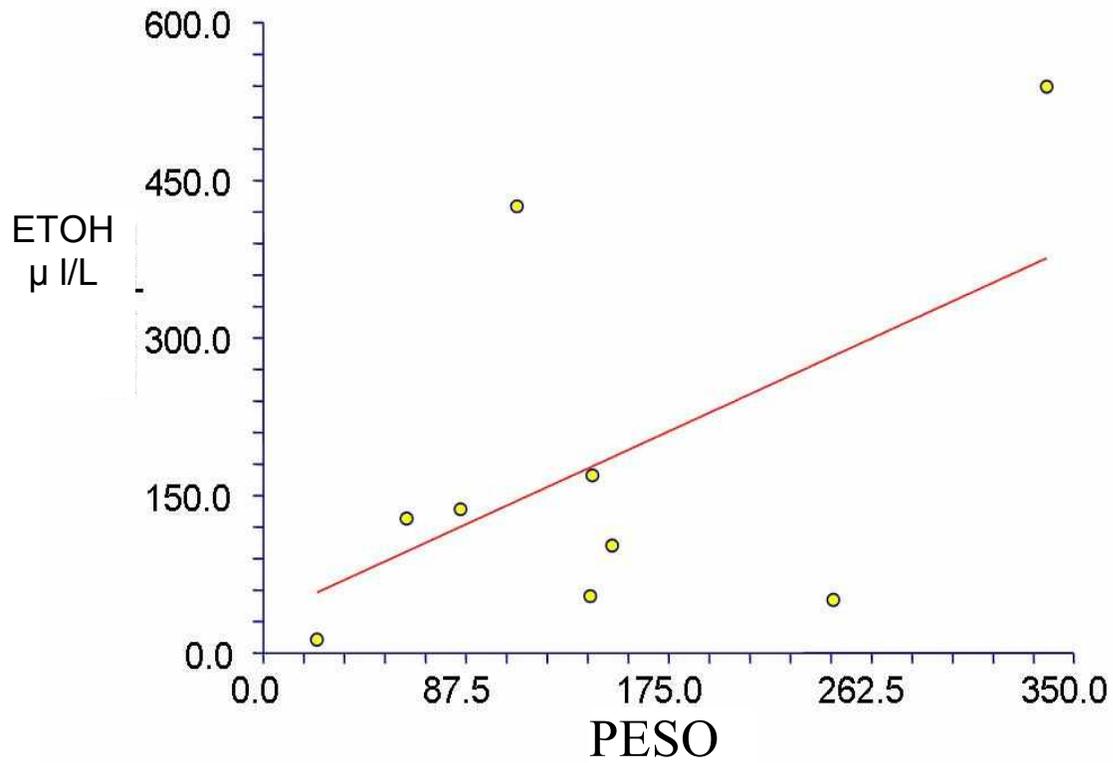


Fig. 16. Tendencias en la acumulación de ETOH en productos voluminosos. Correlación por peso.

Intercepto = 34.2588, pendiente = 1.0095,  $r^2 = 0.2907$ , correlación = 0.5391

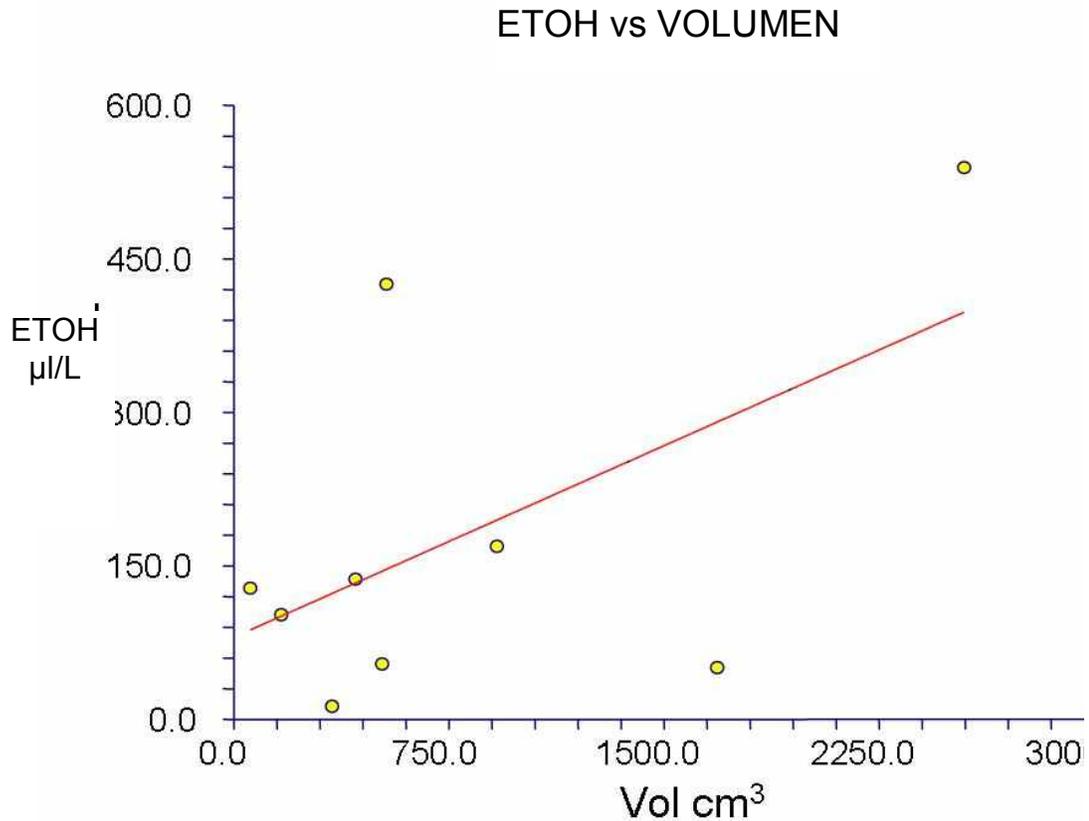


Fig. 17. Tendencias en la acumulación de ETOH en productos voluminosos. Correlación por volumen.

Intercepto = 80.3138, pendiente = 0.1246,  $r^2$  0.3171, correlación = 0.5631

El resultado del análisis de covarianza, efectuado para verificar si la temperatura de almacenamiento influía sobre el patrón de acumulación de ETOH en aquéllos productos hortofrutícolas sensibles al daño por frío, fue el de que no hubo diferencias en las pendientes del patrón de acumulación de dicho compuesto (siguiendo el ejemplo de la versión del paquete estadístico NCSS) (Hintze, 2004),

si bien las proporciones fueron diferentes. El tratamiento con CO<sub>2</sub> ocasionó un incremento en la acumulación de ETOH, en general, cuando los productos se almacenaron a una temperatura más alta (10±1°C, la recomendada dentro del rango óptimo para su almacenamiento).

#### 4.2. DETERMINACIONES DE pH, ACIDEZ TOTAL TITULABLE Y SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES

En la Tabla 4 se reportan los resultados de las determinaciones de los parámetros químicos de calidad de 13 productos hortofrutícolas bajo estudio. Se puede observar que los sólidos solubles totales exhibieron una disminución en general, excepto en el caso de la fresa y el jitomate en los que éstos aumentaron, y en la manzana y la naranja, en las que no se presentaron cambios como efecto del almacenamiento en atmósfera rica en CO<sub>2</sub>.

El pH tendió a aumentar en la mayoría de los productos almacenados en dicha atmósfera y a disminuir en el caso de la toronja y la tuna. No se observaron cambios en el pH en respuesta al almacenamiento en una atmósfera de 30% de CO<sub>2</sub> en: la manzana, el betabel, el jitomate y el pepino.

La acidez total titulable presentó una tendencia significativa a la disminución en la mayoría de los productos hortofrutícolas estudiados a excepción de la tuna, en la cual la acidez total titulable aumentó y en el caso del limón, la manzana, el

jitomate y la zanahoria en los cuales no hubo cambio al exponerse a la atmósfera rica en CO<sub>2</sub>.

No se observó relación alguna entre el patrón de acumulación de ETOH, el pH, la acidez total titulable y los sólidos solubles totales de los productos estudiados.

Tabla 4.- Parámetros químicos analizados en 13 diferentes productos hortofrutícolas en respuesta al almacenamiento en una atmósfera de 30% de CO<sub>2</sub> en aire durante dos días a 7±1°C. Tabla de t-apareada en donde se muestra el valor de t y la significancia del efecto del almacenamiento en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> sobre los parámetros químicos °Brix, pH y acidez titulable de diversos productos hortofrutícolas bajo refrigeración. Se presentan primero las frutas y después las hortalizas en cada grupo y por orden alfabético.

Tabla 4. Valores de la Prueba de t (entre paréntesis valor de probabilidad para el valor de t calculado) para la diferencia entre los parámetros de calidad entre los productos hortofrutícolas expuestos al aire y aquéllos expuestos a atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> (valores positivos de t indican mayor concentración en los testigos y valores negativos de t mayor valor en los experimentales).

\*\* valores significativos a  $p < 0.05$

<b>Producto</b>	<b>°Brix</b>	<b>Ac. total tit. (meq./g de tejido ó mL de jugo)</b>	<b>pH</b>
<b>Grupo 1</b>			
Fresa	t = -7.08** (p=0.0000)	t = 2.82** (p=0.0118)	t = -19.55** (p=0.0000)
Pepino	t = 7.91** (p=0.0000)	t = 11.01** (p=0.0001)	t = 01.67 (p=0.1120)
<b>Grupo 2</b>			
Toronja	t = 3.30** (p=0.0021)	t = 4.80** (p=0.0001)	t = 5.67** (p=0.0001)
Zanahoria	t = 0.21 (p=0.8460)	t = 0.001 (p=0.9999)	t = -3.43** (p=0.0032)

Tabla 4 Cont.			
Producto	°Brix	Ac. total tit. (meq.)	pH
Grupo 3			
Durazno	t = 3.45** (p=0.0012)	t = 4.17** (p=0.0009)	t = -2.22 (p=0.0421)
Kiwi	t = 2.22 (p=0.0443)	t = 2.37 (p=0.0321)	t = -0.21 (p=0.8333)
Manzana	t = -0.27 (p=0.792)	t = -1.65 (p=0.1032)	t = -0.53 (p=0.5973)
Jitomate	t = -3.48** (p=0.0032)	t = -0.75 (p=0.4623)	t = -1.60 (p=0.1234)
Grupo 4			
Naranja	t = 0.63 (p=0.5533)	t = 4.86** (p=0.0025)	t = -6.53** (p=0.0001)
Tuna	t = 2.08 (p=0.0621)	t = -5.17** (p=0.0014)	t = 4.57** (p=0.0004)
Betabel	t = 8.19** (p=0.0001)	t = 11.01** (p=0.0001)	t = 1.67 (p=0.1122)
Grupo 5			
Limón	t = 3.91** (p=0.0011)	t = 1.64 (p=0.1232)	t = -2.59 (p=0.0203)
Plátano	t = 5.72** (p=0.0001)	t = 6.83** (p=0.0001)	t = -4.85** (p=0.0002)

Respecto a los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs estudiados no se observaron cambios en respuesta al tratamiento con 30% (v/v) de CO<sub>2</sub>, balance aire en pepino (Tabla 5) ni en kiwi (Tabla 6) (se anexan las salidas del programa NCSS, resultado de los análisis de varianza en el apéndice I de la tesis).

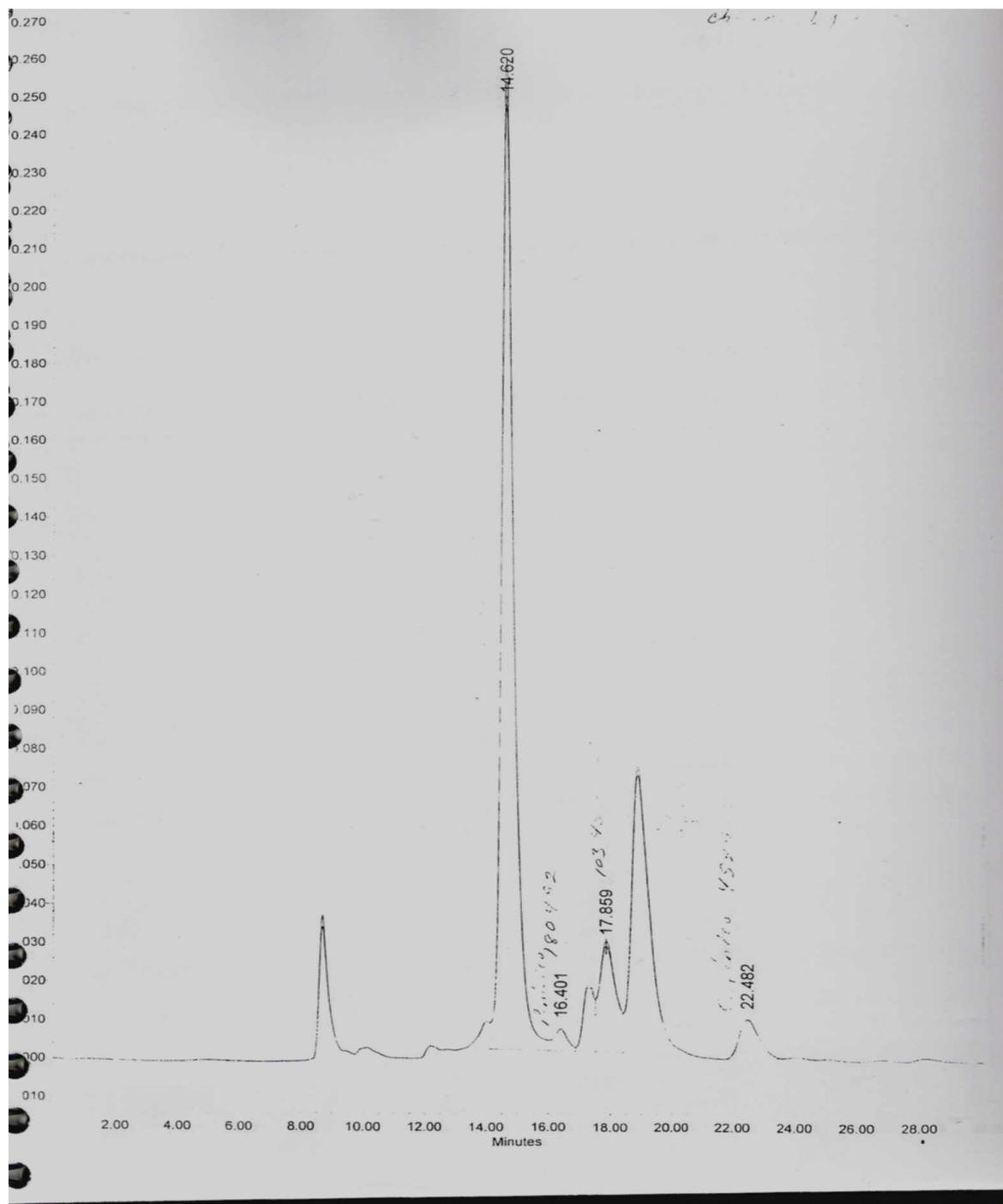
Tabla 5. Promedio (n=18) de la cantidad total de los diferentes ácidos orgánicos (en  $\mu\text{moles/L}$ ) en pepino almacenado en dos tipos de atmósferas, probabilidad de F según el análisis de varianza.

<b>Acido</b>	<b>Aire</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>probabilidad</b>
CÍTRICO	2.3	2.48	0.7986
PIRÚVICO	No detectado	No detectado	-----
MÁLICO	5.0	5.8	0.2377
SUCCÍNICO	4.78	5.37	0.1902

Tabla 6. Promedio (n=18) de la cantidad total de los diferentes ácidos orgánicos (en  $\mu\text{moles/L}$ ) en kiwi almacenados en dos tipos de atmósferas, probabilidad de F según el análisis de varianza.

<b>Acido</b>	<b>Aire</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>probabilidad</b>
CÍTRICO	2.30	2.48	0.798
PIRÚVICO	0.29	0.29	0.9704
MÁLICO	5.82	5.04	0.2377
SUCCÍNICO	4.78	5.37	0.1901

Figura 18.- Ejemplo de cromatograma con diferentes ácidos orgánicos evaluados. Tiempo de retención: 14' = ácido cítrico. Tiempo de retención: 16' = ácido pirúvico. Tiempo de retención: 17.8' = ácido málico. Tiempo de retención: 22.5' = ácido succínico



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Acumulación de ETOH

En 1925, Thomas reportó hallazgos de 6  $\mu\text{L/L}$  de ETOH en tejidos de manzana sanos en condiciones normales, demostrando así que este compuesto está presente incluso en tejidos vegetales sanos. En el presente estudio se encontró ETOH acumulado en prácticamente todos los productos hortofrutícolas (incluso en trazas), lo cual concuerda con los hallazgos de Thomas (1925) y también con los de otros autores como Pelayo (*et al.*, 2003). Sin embargo, hubo gran variabilidad entre productos con respecto a sus niveles iniciales de ETOH. Estos resultados apoyan a las observaciones realizadas por Chen y Chase (1993), quienes observaron una isozima de la ADH, la ADH2, presente en frutos de jitomate maduros. En sus resultados reportan que, durante la maduración de dichos frutos, de madurez fisiológica (verde maduro) a la madurez de consumo (rojo maduro), el mRNA para la ADH2 aumenta de tres a cuatro veces. Ellos concluyen que la inducción de la ADH2 durante la maduración es controlada independientemente del ambiente de estrés al que se puedan someter los tejidos vegetales. Como se mencionó con anterioridad, Speirs *et al.*, (2002) concluyeron que la enzima ADH está involucrada normalmente en diversos aspectos del desarrollo del sabor en frutos como el jitomate, en particular, en la regulación de la acumulación de algunos aldehídos y alcoholes, característicos del sabor de dicho fruto.

Zemlianukhin e Ivanov (1978), estipularon que la difusión de gases también está influenciada por el envejecimiento de los órganos vegetales, lo cual se pudo

constatar en el caso del kiwi, y su atmósfera interna está determinada por la composición ambiental y algunos rasgos metabólicos de sus células. Otra explicación puede ser la que Chen y Chase (1993) proporcionan respecto a sus observaciones sobre la inducción de la isozima ADH2 durante la maduración del jitomate, adicionándose al efecto del almacenamiento de dicho producto en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>. Se deben hacer más experimentos de este tipo para corroborar si sucede lo mismo en otros productos.

#### 5.1.1. Volumen

Muchos investigadores han reportado altas concentraciones de CO<sub>2</sub> e incluso bajos contenidos de O<sub>2</sub> en tejidos vegetales provenientes de productos hortofrutícolas voluminosos (Zemlianukhin e Ivanov, 1978; Burton, 1982b). Se han señalado contenidos de 13 a 19% (v/v) de O<sub>2</sub> y un 2.5 a 7% (v/v) de CO<sub>2</sub> en las capas superficiales de manzanas almacenadas, mientras que en las porciones centrales del fruto, la cantidad de O<sub>2</sub> fue de 1 a 3% y la de CO<sub>2</sub> fue de 25 a 30% (v/v) (Burton, 1982b). Por lo tanto, es posible encontrar condiciones de anaerobiosis en los tejidos internos de estos productos vegetales. Se ha sugerido que los niveles internos de CO<sub>2</sub> en los tejidos vegetales como el parénquima, podrían provenir de la ruta de las pentosas fosfato, el ciclo del ácido tricarbóxico mismo, o cualquier otra ruta cuyo producto secundario sea el CO<sub>2</sub>, de ahí que el CO<sub>2</sub> se acumule en algunas regiones, y pueda proporcionar un microambiente adecuado para la fermentación etanólica y su subsecuente acumulación (Douce, 1985; Miernyk, 1990).

En este estudio, las grandes concentraciones de ETOH, previas al almacenamiento de los diversos productos estudiados, fueron encontradas en durazno, naranja, plátano, toronja, jitomate, y pepino, y, con excepción de la papa, estos productos hortofrutícolas eran los más voluminosos que se estudiaron. En el caso peculiar de la papa, a pesar de ser voluminosa, acumuló trazas de ETOH previo a su almacenamiento, las cuales aumentaron más o menos 10 veces después de 2 días de almacenamiento. Este hecho es consistente con las observaciones de Buttbaker *et al.* (1967) en papas almacenadas en atmósferas controladas, aunque, en lugar de usar sólo altos niveles de CO<sub>2</sub> en las mismas, usaron además bajos niveles de O<sub>2</sub>, lo cual se ha demostrado que realza su acción, es decir, el efecto observado aumenta debido a la interacción de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y bajos niveles de O<sub>2</sub>. Buttbaker *et al.* (1967) señalan la capacidad buffer de la papa que impide cualquier cambio en el pH y piensan que éste podría ser el motivo por el que la papa no acumula grandes cantidades de ETOH.

En el caso particular de los resultados observados en el plátano almacenado en CO<sub>2</sub> la temperatura de almacenamiento a 7°C pudo haber influenciado enormemente el efecto adverso de la atmósfera rica en este gas, ya que dicho producto sufre daño por frío a esa temperatura. Sería muy conveniente realizar un experimento de doble control a la temperatura recomendada para su almacenamiento (~14°C), la cual no se logró obtener, desafortunadamente, en las instalaciones disponibles para llevar a cabo estos experimentos. De manera que, por los resultados observados, se puede suponer que la aparente disminución en

la acumulación de ETOH observada cromatográficamente, posterior a las 35 horas de almacenamiento en refrigeración y CO<sub>2</sub>, pudo deberse a la total ruptura de los tejidos de este fruto y la consecuente evaporación del ETOH.

Crawford (1978) sugirió una base bioquímica para explicar las diferencias en sensibilidad de los tejidos vegetales a la anoxia mediante los productos de la fermentación. De acuerdo con sus observaciones, las especies tolerantes a la anoxia no experimentan fermentación. En este estudio se observó acumulación de ETOH incluso previamente al almacenamiento de los productos en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, observación catalogada como “Efecto Crabtree” (Matile, *et al.*, 1969).

Además, también es importante considerar que los tejidos pueden perder su tolerancia a las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> debido al efecto acumulativo del mismo durante su almacenamiento por su senescencia en incremento, o bien, el alcance de un umbral de concentración de CO<sub>2</sub> que dispara el proceso de fermentación etanólica. Todo lo anterior puede explicar aquéllos patrones de acumulación de ETOH en forma cuadrática positiva (Thomas, 1925, Mitz, 1979 y Burton, 1982b).

### 5.1.2. Temperatura

Los resultados de los experimentos de doble control en aquellos productos que se pudieron almacenar a temperaturas de (10 – 12°C) indican que no hay cambios en la pendiente resultante de la acumulación de ETOH en aquéllos productos sensibles al daño por frío almacenados en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> a bajas temperaturas (7±1°C), cuando se compara con la obtenida a temperaturas

recomendadas para su almacenamiento ( $10\pm 1^\circ\text{C}$  o incluso mayores), no obstante se notó mayor incremento en la acumulación de ETOH cuando se almacenaron dichos productos bajo estas últimas temperaturas. El análisis de covarianza se utiliza para probar si existen diferencias entre las pendientes (valores lineales) de las regresiones entre las dos temperaturas de almacenamiento, para aire y para  $\text{CO}_2$  en su caso. En el modelo el período de almacenaje se tomó como una variable continua, siendo ésta la variable independiente, mientras que la temperatura es una variable discreta. De esta forma, la interacción período X temperatura resulta una prueba del paralelismo entre ambas pendientes (SAS, 2005).

La temperatura afecta a la velocidad del metabolismo, y ejerce un efecto directo sobre la solubilidad de los gases (Burton, 1982a). A velocidades metabólicas más altas, ocasionadas por un incremento en la temperatura, el efecto de la resistencia a la difusión de los gases es más serio. Así, de acuerdo con Burton (1982a), una alta temperatura aumenta la utilización de  $\text{O}_2$ , disminuyendo las concentraciones de  $\text{O}_2$  intercelular y reduciendo los niveles de  $\text{O}_2$  disuelto en equilibrio con dicha concentración ya reducida. Esto ocasiona un incremento de la necesidad de  $\text{O}_2$  por parte de los tejidos vegetales y la consiguiente acumulación de  $\text{CO}_2$ , agravando la tendencia hacia la anaerobiosis (Lougheed, 1987), o, en este caso, al efecto "Crabtree" por  $\text{CO}_2$ . Se podría postular que el  $\text{CO}_2$  pudiera haber realizado la producción de ETOH, en los productos sensibles al daño por frío bajo estudio, al ser almacenados a una temperatura más alta, promoviendo la actividad de las enzimas de la fermentación (Mitz, 1979).

Las implicaciones prácticas que se desprenden de todas estas observaciones consisten en la capacidad de considerar si los diversos productos soportan el almacenamiento en atmósferas ricas en  $\text{CO}_2$  como auxiliares a la refrigeración. Así, en los casos de los productos que presentaron un comportamiento lineal, como la papa y la pitaya de mayo, se debe tomar en cuenta la proporción de ETOH acumulado para decidir si deben o no ser almacenados en  $\text{CO}_2$ , ya que su acumulación de ETOH es mínima, por lo que es recomendable este tipo de almacenamiento. Aquellos productos que presentaron una tendencia cuadrática positiva hacia la acumulación de ETOH tienen buena resistencia a dichas atmósferas durante un período de almacenamiento, por lo que deberán ser conservados en las mismas sólo por un corto tiempo, mientras la acumulación de ETOH sea estable, y posteriormente deben exponerse al aire para que exuden o metabolicen el ETOH. Se podría suponer que los productos con tendencia a la acumulación de ETOH cuadrática negativa no soportan el almacenamiento en atmósferas ricas en  $\text{CO}_2$ , ya que en un momento la acumulación de ETOH aparentemente puede dispararse, después de lo cual parece metabolizarse o exudarse a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, en el caso del plátano, éste presentó severos síntomas de daño por  $\text{CO}_2$ , los cuales, deterioraron su apariencia y, por tanto, su calidad. De manera que se deben considerar otros parámetros adicionales a la acumulación de ETOH para determinar si el producto bajo estudio resiste el

almacenamiento bajo condiciones de altos niveles de CO<sub>2</sub> o, incluso, estimar por cuánto tiempo máximo se deben almacenar en dichas atmósferas, antes de su deterioro.

Es importante considerar otros factores que pueden afectar la calidad de los productos hortofrutícolas durante el almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>. Así por ejemplo, la lechuga orejona presenta un patrón cuadrático positivo de acumulación de ETOH, lo cual le confiere teóricamente, buena capacidad para soportar su conservación en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, durante los primeros días de almacenamiento. Sin embargo, poco tiempo después de exponerse al aire aparecen manchas de color marrón o rosas en sus estructuras blancas, lo cual concuerda con los hallazgos de Brecht *et al.* (1973a y b), correspondientes a un desorden fisiológico llamado "Pink Rib", "costilla rosada", que consiste en la adquisición de una coloración rosada de las estructuras blancas de dicho vegetal, lo cual deteriora su apariencia y, por tanto, su calidad comercial (Stewart y Uota, 1971). El plátano almacenado en la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> presentó un color grisáceo, que ocasionó un severo detrimento en su aspecto, por lo cual las personas a las que se pidió su opinión sensorial se negaron a probarlo. Cabe hacer notar que, recién extraídos de su almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, los productos estudiados exhibían el aroma característico de dicho gas. Esto fue ocasionalmente percibido por las personas que emitieron su opinión organoléptica, sin embargo, bastaban unos segundos para que dicho aroma desapareciera y el sabor característico de los productos probados no cambió.

### 5.1.3. Color

Los productos hortofrutícolas verdes presentaban una bella apariencia verde brillante después de haber sido almacenados en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> debido a la conservación de la integridad de la estructura de la clorofila y a la fotosíntesis, aún activa, en dichos productos.

El plátano presentó una coloración grisácea, señal de daño por CO<sub>2</sub>, debido al deterioro de sus tejidos.

## **5.2. pH y acidez total titulable**

En el caso de las determinaciones de pH y acidez total titulable se debe tomar en cuenta que dichos análisis fueron hechos en homogeneizados de tejidos vegetales, es decir, se rompió la compartimentalización de las células. El pH es un parámetro que mide iones disociados en las soluciones, quizá por esta razón no se ven con claridad los cambios finos que puedan existir en los homogeneizados bajo estudio en respuesta al tratamiento con CO<sub>2</sub>. En cambio la acidez titulable mide iones disociados y no disociados, lo cual amplía el panorama y puede proporcionar una idea más precisa de la existencia de cambios en los homogeneizados evaluados. Sin embargo, por todas estas razones se ha decidido comparar, en investigaciones posteriores, estos resultados con las determinaciones de pH intracelular de los ejemplares bajo estudio mediante un colorante fluorescente y en células cuya compartimentalización esté lo más intacta posible.

Lo que se pudo observar en este estudio, mediante las determinaciones de pH en homogeneizados de pulpa fue una tendencia al aumento de este parámetro, ligero pero significativo, en los casos del durazno, la fresa, el limón, la naranja, el plátano y la zanahoria, probablemente debido a la formación y disolución del ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) en el jugo de los productos hortofrutícolas estudiados, concordante con los hallazgos de Miller y Dowd (1936) en jitomates, Thornton (1937) en diversos productos hortofrutícolas y Leberman *et al.* (1968) en brócoli. Estadísticamente hablando, los resultados son significativos debido a que hay muy poca variabilidad entre las repeticiones, por tanto, cualquier cambio, por ligero que sea, será significativo. La solubilidad de los gases es mayor a bajas temperaturas de almacenamiento, por tanto, el  $\text{CO}_2$  es más soluble a  $7^\circ\text{C}$  que a la temperatura del laboratorio ( $\pm 24^\circ\text{C}$ ). El cambio observado en el pH podría deberse a la adsorción del  $\text{CO}_2$  en la superficie de los productos estudiados y a la subsecuente ionización del ácido carbónico. Esta hipótesis se basa en observaciones realizadas en tejidos animales (Brody, 1989), se tendrían que realizar estudios para comprobarla en el caso de los tejidos vegetales estudiados. Roberts *et al.* (1981) realizaron cálculos basados en la fuga de iones  $\text{H}^+$  y la capacidad amortiguadora del citoplasma en tejidos de ápice de raíz de maíz. Los resultados obtenidos les hicieron suponer que podría esperarse un aumento en el pH del citoplasma en la ausencia de un mecanismo regulador del pH en los tejidos vegetales. Bown (1985) postuló que un aumento en el pH citoplásmico estimula la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP), y la generación de iones  $\text{H}^+$ . La evidencia que obtuvo para sostener su hipótesis resultó de experimentos que demostraron la actividad *in vitro* de dicha enzima, sin embargo,

los cambios en pH observados eran de la índole de 7 y 8 unidades de pH. En el presente estudio los cambios encontrados sólo fueron de un máximo de 1.2 unidades de pH, las cuales no se aproximaron incluso a las unidades de pH consideradas en dicha escala como neutras. Todo lo anterior refuerza la opinión de Smith (1963) sobre la falta de claridad sobre el efecto del CO<sub>2</sub> en el contenido total de ácidos de las frutas al menos cuando se trabaja con homogeneizados de los jugos de las mismas.

Cabe hacer notar que el cambio observado en los productos analizados mostró ser imperceptible al paladar de las personas que proporcionaron su opinión sensorial.

El pH no sufrió cambios en el kiwi, la manzana el betabel, el jitomate, y el pepino y en los únicos casos en que se observó una ligera pero significativa disminución en el pH fue en los homogeneizados de toronja y tuna, coincidente con los hallazgos de Roberts *et al.* (1984a y b) en ápices de raíces de maíz, en cuyo caso Prange *et al.*, (2005) sugieren 3 tipos de hipótesis cuando se trata de una situación anaerobia: la probable producción de iones de H<sup>+</sup> debido a la formación de lactato; la fuga de iones de H<sup>+</sup> de la vacuola o la hidrólisis de nucleótidos (NTP's), por ejemplo, que el ATP libere iones de H<sup>+</sup>. Quizá se puedan aplicar estas mismas hipótesis al tratarse de un ambiente rico en CO<sub>2</sub> aunque se cuente con la concentración de O<sub>2</sub> prácticamente a niveles normales (16-18%). En el caso particular de la tuna, cuyo patrón de acumulación de ETOH cambió a cuadrático negativo, se puede explicar la disminución en el pH por efecto de las

altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera de almacenamiento, debida a la fijación de este compuesto por el piruvato, la adición de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , dando como resultado malato +  $\text{NADP}^+$  (Goodwin y Mercer,1974), característico de su metabolismo CAM y quizá por esta razón esta fruta no haya acumulado ETOH hacia el final de su período de almacenamiento. Este resultado concuerda con los hallazgos de Ranson (1953).

En general se observó una relación inversa entre las mediciones de pH y la acidez total titulable, lo cual no concuerda con los hallazgos de Stoll (1958). Sin embargo, Siriphanich y Kader (1986) observaron esta misma relación en tejidos de lechuga y atribuyen dicha tendencia opuesta a un mecanismo regulador del pH que pudiera estar operando cuando los productos son expuestos a altas concentraciones de  $\text{CO}_2$ .

### **5.3. Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos presentaron un comportamiento irregular durante el tiempo de experimentación (una tendencia polinomial) sin cambios significativos, coincidente con los resultados de Wager (1974b) en chícharos verdes respecto a su contenido de ácido cítrico. Se denota, en todos los casos, una muy ligera tendencia hacia el aumento en la concentración de los ácidos del ciclo de Krebs estudiados, contrario a los hallazgos de Wager (1974a) en chícharos verdes respecto a su contenido de ácido málico y Frenkel y Patterson (1977) en peras, pero coincidente con los resultados de Wager (1974b) en berros en cuanto al contenido de ácido málico, así como en que la tendencia a la acumulación de ácido succínico es a coincidir con los resultados de Yahia y Carrillo-López en

aguacate y los hallazgos de Hulme (1956) en manzanas, Frenkel y Patterson (1977) en peras Bartlett y Wager (1974b) en chícharos verdes con respecto a su contenido de dicho ácido. Esto podría ser una de las razones por las que no se detectaran grandes cambios en el pH y en la acidez total titulable de los productos bajo estudio. Un aumento, en general, del pH citoplásmico, podría no disparar la síntesis de ácidos orgánicos (Roberts *et al.*, 1981). No fue posible detectar mediante el método utilizado el ácido pirúvico en el pepino, quizá debido a que en este producto sólo existan trazas imperceptibles, por la columna utilizada, de este ácido.

#### **5.4 Sólidos solubles totales**

Con respecto al contenido de sólidos solubles totales (°Brix), este parámetro representa el contenido de minerales, ácidos orgánicos y azúcares, principalmente sacarosa, detectados por el refractómetro, en los productos vegetales. Este parámetro tendió a disminuir significativamente en general, excepto en los casos de la fresa y el jitomate, en los cuales este parámetro se incrementó, coincidiendo así con los resultados observados por Garosi, *et al.* (1997) en chabacanos, y no se observaron cambios en manzana, naranja, tuna, y zanahoria coincidente con los hallazgos de Berry y Aked (1997) en uvas de mesa. Los resultados obtenidos sobre la disminución de los sólidos solubles totales en la mayoría de las muestras coinciden con los obtenidos por Thompson (1998) en diversos productos, y con los de Öz *et al.* (2005), quienes aplicaron un tratamiento con hielo seco a los frutos de pèrsimo para madurarlos artificialmente. Después de 48 horas, ellos encontraron una gran disminución en los sólidos solubles totales de aquéllos frutos

tratados con CO<sub>2</sub>, siendo ésta más marcada en el tratamiento con mayor concentración (80% v/v) de CO<sub>2</sub>. También coinciden con los hallazgos de Sankat y Basanta (1997) en frutos de pomeroac. Ellos atribuyen la disminución significativa en el contenido de sólidos solubles totales, en respuesta al almacenamiento de los productos estudiados en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, a la pérdida de azúcares reductores, es decir, de aquéllos azúcares que tienen un grupo aldehído libre o potencialmente libre y, por tanto, tienen la habilidad de actuar como un agente reductor o aceptor de electrones en una solución alcalina (i.e. glucosa, fructosa, galactosa, manosa, ribosa y xilosa) (Kays, 1991). Esto se atribuye a la probable supresión de la respiración de los mismos. En el presente estudio se podría pensar en un retraso en la actividad respiratoria, ya que dichos cambios fueron someros. Sin embargo, la disminución en dicho parámetro observada en este estudio no fue percibida en el paladar de las personas que emitieron su opinión sensorial.

## 6 CONCLUSIONES

- Existe la producción y acumulación de ETOH en los tejidos vegetales en buen estado, vigorosos, limpios, y almacenados en atmósfera de aire normal.
- En la mayoría de los productos, hasta ahora estudiados, se presentó un aumento en la acumulación de ETOH en respuesta a su almacenamiento, durante 52 horas, en una atmósfera de 30% de CO<sub>2</sub> (v/v) en aire.
- Se observaron cinco tendencias principales a la acumulación de ETOH en los productos estudiados en respuesta a su almacenamiento en atmósfera rica en CO<sub>2</sub>: 1) una lineal constante, observada en ciruela roja, fresa, pitaya de mayo y pepino; 2) la cuadrática positiva constante observada en brócoli, col y zanahoria; 3) la cuadrática negativa constante, observada en la toronja y la tuna blanca; 4) los que iniciaron como lineal y luego cambiaron ya sea a cuadrática positiva, como fueron los casos de: el durazno, el kiwi, la manzana Red Delicious, el jitomate de bola, la lechuga orejona, y la papa blanca, o a cuadrática negativa como fueron los casos de la la naranja Valencia y uva Thompson Seedless, en respuesta al almacenamiento en CO<sub>2</sub> y 5) los que cambiaron su patrón de acumulación de ETOH de cuadrático positivo a cuadrático negativo, en respuesta al almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> como fueron los casos de: el limón persa, el plátano tabasco, y el betabel.

- El grado de madurez influyó en la proporción de ETOH acumulado: a mayor grado de madurez mayor fue la acumulación de ETOH, pero no en la tendencia cuadrática en respuesta al almacenamiento en 30% (v/v) de CO<sub>2</sub> en el kiwi.
- Otros parámetros químicos, como el contenido de sólidos solubles totales, influyeron en la acumulación de ETOH en la mayoría de los productos estudiados en respuesta a su almacenamiento en altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, los cuales presentaron, en general, una relación inversa a la acumulación de ETOH.
- Con excepción de la papa se observó una aparente tendencia a la influencia del peso o volumen del producto en la acumulación de ETOH como respuesta a su almacenamiento en altas concentraciones de CO<sub>2</sub>.
- Para fines prácticos, se debe considerar en cuanto a acumulación de ETOH, aquellos productos que presentaron un patrón cuadrático positivo como los ideales para su almacenamiento en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, seguidos por los que presentaron una tendencia lineal y, por último, y considerando las proporciones de ETOH acumuladas, a aquellos productos que presentaron una tendencia cuadrática negativa de acumulación de ETOH. Cabe aclarar que, como en todos los casos en los que se plantean reglas, existen excepciones, por lo que, además de considerar los patrones de acumulación de ETOH de los diversos productos hortofrutícolas, deben tomarse en cuenta otros factores que pueden

afectar la calidad de los mismos al ser almacenados en este tipo de atmósferas, como los daños que pudiera ocasionar el CO<sub>2</sub> a determinados productos sensibles al mismo, tal fue el caso del plátano tabasco, cuyo patrón de acumulación de ETOH fue cuadrático negativo debido a que fue severamente dañado por el CO<sub>2</sub> en sus tejidos y el ETOH pudo haberse evaporado.

Con respecto a los parámetros químicos determinados se encontró que:

- El pH tendió a aumentar en los homogeneizados de la mayoría de los productos analizados, en respuesta al almacenamiento en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>, aunque dicho aumento no llegó a los niveles alcalinos.
- La acidez total titulable de los productos hortofrutícolas bajo estudio presentó una tendencia a la disminución en general, en la mayoría de los homogeneizados de los productos hortofrutícolas estudiados, en respuesta al tratamiento con altas concentraciones de CO<sub>2</sub>
- Los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs estudiados: cítrico, málico, pirúvico y succínico no sufrieron cambios significativos en respuesta al almacenamiento de los productos estudiados en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>.
- Los sólidos solubles totales presentaron una disminución, en general, en respuesta al almacenamiento de los productos en atmósfera de 30% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire.

- En el caso particular del plátano se observó un aparente efecto aditivo de la baja temperatura (7°C) con el tratamiento con altas concentraciones de CO<sub>2</sub>.
- Los productos hortofrutícolas verdes realzaron su apariencia después del almacenamiento en altas concentraciones de CO<sub>2</sub>.
- La proporción de ETOH se incrementó con la temperatura, sin afectar su patrón de acumulación en los productos hortofrutícolas estudiados.
- La acumulación de ETOH no es el único parámetro que se debe considerar para la elaboración de criterios y decisiones para almacenar los productos hortofrutícolas en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> sino que se deben considerar otros factores como los sensoriales y bioquímicos.
- Se deben comparar los resultados de las determinaciones de pH y acidez total titulable con las determinaciones de pH intracelular en células vegetales provenientes de los productos bajo estudio, con su compartimentalización celular lo más íntegramente posible.
- Los resultados de las pruebas piloto sensoriales no indicaron diferencias en el sabor o apariencia de la mayoría de los productos hortofrutícolas estudiados, excepto en el caso del plátano.

- En este estudio se observó que el almacenamiento de los productos hortofrutícolas en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> pero con niveles de O<sub>2</sub> muy próximos a los de una atmósfera normal (16-18% v/v) produce efectos iguales a los de una atmósfera anaerobia.

## 7. LITERATURA CITADA

- Ahmadi, H., Biasi, W.V., y Mitcham, E.J. 1999. Control of brown rot decay of nectarines with 15% carbon dioxide atmospheres. In: J. Amr. Soc. Hort. sci. 124(6): 708-712.
- Alexander, L. y Grierson D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. In: Journal of Experimental Botany. Vol.53. No. 377. pp. 2039-2055.
- Allen, F.W. y Smock, R.M. 1937. Carbon dioxide storage of apples, pears, plums and peaches. J. Am. Soc. Hort. Sci. 98: 464-468.
- Alltech Quality Assurance Chromatogram Instruction Manual. Alltech IOA-1000 P/N: 9646. 10 pp.
- Alonso, M., Palou, L., Del Río, M.A. y Jacas, J. 2005. Effect of short term exposure to CO<sub>2</sub> –enriched atmospheres on ‘Valencia’ orange quality. In: Mencarelli, F., Tonutti, P. (Eds.). Proceedings of the Fifth International Postharvest Symposium. Acta Horticulturae No. 682. Vol. 2. ISHS. Bélgica. pp.1077-1082.
- Anderson, R.E. y Hardenburg, R.E. 1977. Results and recommendations on controlled and modified atmosphere storage and transport of stone fruits. In: Dewey, D.H. (Ed.). Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities. Department of Horticulture. Horticultural Report No. 28. Michigan State University, East Lansing, Michigan. U.S.A. pp. 235-241.

- Andrews, C.J. y Pomeroy, M.K. 1979. Toxicity of anaerobic metabolites accumulating in winter wheat seedlings during ice encasement. *Plant Physiol.* 64: 120-125.
- Anónimo, 1979. Tercer anteproyecto del manual de prácticas recomendadas para la cosecha, transporte y selección, clasificación, envasado y conservación de frutas en estado fresco. en: *Prácticas Recomendadas México*, C.N.F.-16. Departamento de Normalización e Inspección de Calidad Frutícola. CONAFRUT. México, 16 pp.
- Argenta, L.C., Fan X., y Mattheis, J.P. 2002. Responses of 'Fuji' apples to short and long duration exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentration. In: *Postharvest Biology and Technology* 24(1): 13-24. Elsevier Science B.V.
- Barford, J.P. y Hall. R.J. 1979. An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. *J. of Gen. Microbiol.* 114: 267-275.
- Bender, R.J., y Brecht, J.K. 2000. Aroma volatiles of mature-green and tree-ripe 'Tommy Atkins' mangoes after controlled atmosphere vs. air storage. In: *HortScience* 35(4): 684-686.
- Berry, G. y Aked J. 1997. Controlled atmosphere alternatives to the post-harvest use of sulphur dioxide to inhibit the development of *Botrytis cinerea* in table grapes. In: *International Controlled Atmosphere Research Conference*. University of California, Davis, U.S.A. pp. 160-164.
- Bertolini, P., Baraldi, E., Mari, M., Trufelli, B. y Lazzarin, R. 2003. Effects of long term exposure to high-CO<sub>2</sub> during storage at 0°C on biology and infectivity of *Botrytis cinerea* in red chicory. *J. Phytopathology.* 151: 201-207.

- Bown, A.W. 1985. CO<sub>2</sub> and intracellular pH. *Plant Cell and Env.* 8: 459-465.
- Brecht, P.E., Kader, A.A., y Morris, L.L. 1973a. The effect of composition of the atmosphere and duration of exposure on brown stain of lettuce. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 98(6): 536-538.
- Brecht, P.E., Kader, A.A., y Morris, L.L. 1973b. Influence of postharvest temperature on brown stain of lettuce. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 98(4): 399-402.
- Brody, A.L. 1989. Modified atmosphere/vacuum packaging of meat. In: Brody A.L. CONTROLLED/MODIFIED ATMOSPHERE/VACUUM PACKAGING OF FOODS. Cap. 2. Food and Nutrition Press, Inc. Trumbull, Conn. U.S.A. pp. 23.
- Browne, K.M., Geeson, J.D., y Dennis, C. 1984. The effects of harvest date and CO<sub>2</sub>-enriched storage atmospheres on the storage and shelf-life of strawberries. *J. Hort. Sci.* 59(2): 197-204.
- Buescher, R.W. y Brown, H. 1979. Regulation of frozen snap bean quality by postharvest holding in carbon-dioxide enriched atmospheres. *J. Food Sci.* 44(5): 1494-1497.
- Buescher R.W. y Adams, K. 1983. Basis for enhanced softening of snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from postharvest exposure to carbon dioxide. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108(1): 58-60.
- Buescher, R.W. y Henderson, J. 1977. Reducing discoloration and quality deterioration in snap beans (*Phaseolus vulgaris*) by atmospheres enriched with CO<sub>2</sub>. *Acta Horticulturae* 62: 55-59.
- Burton, W.G. 1982a. The effect of temperature upon oxygen and carbon dioxide concentrations in the tissues. The physiological implications of structure:

- exchange of gases. In: Post-Harvest Physiology of Food Crops. Chapter 4. Ed. Longman. U.S.A. pp 95-96.
- Burton, W.G. 1982b. Manipulation of postharvest physiology to extend storage life. In: Post-Harvest Physiology of Food Crops. Chapter 10. Ed. Longman, U.S.A. pp 249.
- Butcbaker, A.F. Nelson, D.C., y Shaw, R. 1967. Controlled-atmosphere storage of potatoes. Am. Soc. Ag. Eng. Trans. 10: 534-538.
- Chen, R.S. y Chase, T. Jr. 1993. Alcohol dehydrogenase 2 and pyruvate decarboxylase induction in ripening and hypoxic tomato fruit. Plant Physiol. Biochem. 31(6): 875-885.
- Chirkova, T.V: 1978. Some regulatory mechanisms of plant adaptation to temporal anaerobiosis. In: Hook, D.D. Crawford M.M. (Eds.). Plant life in Anaerobic Environments. Cap. 5. Ann Arbor Science Publishers Inc. U.S.A. pp. 137-154.
- Corrales-García, J. 1997. Physiological and biochemical responses of "Hass" avocado fruits to cold-storage in controlled atmospheres. In: Kader A. (ed.) International Controlled Atmosphere Research Conference. Department of Pomology. University of California, Davis. U.S.A. Vol. 3. Postharvest Horticultural Series. No. 17. pp. 69-74.
- Cossins, E.A. 1978. Ethanol metabolism in plants. In: Hook, D.D. Crawford M.M. (Eds.). Plant life in Anaerobic Environments. Cap. 7. Ann Arbor Science Publishers Inc. U.S.A. pp. 169-202.
- Crawford, R.M.M. 1978. Metabolic adaptations to anoxia. In: Hook, D.D. Crawford M.M. (Eds.). Plant Life in Anaerobic Environments. Cap. 4. Ann Arbor Science Publishers Inc. U.S.A. pp.119-133.

- Daniel, 2001. Estadística no paramétrica y de libre distribución. Prueba de Mann-Whitney. En: BIOESTADÍSTICA. BASE PARA EL ANÁLISIS DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD. Cap. 11. 3a. ed. UTEHA. Noriega Editores. México. pp. 718-722.
- Davies, P.L. y Chace, W.G., Jr. 1969. Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. HortSci. 4(2): 117-119.
- Dennis, D.T., y Turpin D.H. (eds) 1990. Carbon Metabolism in Mitochondria. In: Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Cap. 8. Ed. Longman Scientific & Technical U.S.A. pp. 106-123.
- Ding, C., Chachin, K., Ueda, Y., Imahori Y., y Wang C.Y. 2002. Modified atmosphere packaging maintains postharvest quality of loquat fruit. In: Postharvest Biology and Technology. 24(3): 341-348. Elsevier Science B.V.
- Donaldson, R.P., Soochan, P., y Zaras, A. 1985. Anaerobic stress in germinating castor bean, ethanol metabolism and effects on subcellular organelles. Plant Physiol. 77: 978-983.
- Douce, R. 1985. Mitochondrial oxidative activities in relation to *in vivo* metabolism. Cap. 4. In: Mitochondria in Higher Plants. Ed. Academic Press, Inc. U.S.A. pp. 227-232.
- Draper, N. y Smith H. 1998. Applied Regression Analysis. 2a. ed. John Wiley & Sons. New York. U.S.A. pp. 458-517.
- El-Goorani, M.A. y Sommer, N.F. 1981. Effects of modified atmospheres on postharvest pathogens of fruits and vegetables. Hort. Rev. 3: 413-461.

Enzyme nomenclature 1984. Recommendations of the nomenclature committee of the International Union of Biochemistry. Ed. Academic Press. U.S.A. 30 pp.

Fidler, J.C. 1968. The metabolism of acetaldehyde by plant tissues. *J. Expt. Bot.* 19:41-51.

Francis, F.J. y Clydesdale, F.M. 1975. Tristimulus colorimeters. In: *Food Colorimetry: Theory and Applications*. Cap. 9. Ed. AVI Publishing Company, Inc. Westport, Conn. U.S.A. pp. 89-93.

Frenkel, C. y Patterson, M.E. 1974. Effect of carbon dioxide on ultrastructure of 'Bartlett' pears. In: *Hortscience* 9(4): 338-340.

Frenkel, C. y Patterson, M.E. 1977. Metabolic effects of CO<sub>2</sub> in 'Bartlett' pears. In: *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Dewey, D.H. (Ed.). Dept. of Horticulture. Horticultural Report No. 28. Michigan State University. East Lansing, Michigan, U.S.A. pp. 10-14.

Galensa, R. 1993. Analysis of Food Ingredients. In: Matissek R. y Wittkowski R. *High Performance Liquid Chromatography in Food Control and Research*. Cap. 2. Ed. Technomic Publishing Co. Inc. Alemania. pp. 103-110.

Garosi, F., Ceccantoni B., Botondi R., Massantini, R., y Mencarelli F. 1997. Influence of extreme atmospheres-short term (EAST) treatments at room temperature on apricot quality. In: *Controlled Atmospheres Research Conference*. University of California, Davis. U.S.A. Julio 13-18. pp. 139-148.

González-Meler M.A., Taneva L. y Trueman R.J. 2004. Plant respiration and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration: cellular responses and global significance. Invited Review. In: *Annals of Botany* 94: 647-656.

Goodwin T.W. y Mercer E.I. 1974. INTRODUCTION TO PLANT BIOCHEMISTRY. Ed. Pergamon Press LTD. U.S.A. 359 pp..

Grove, T.; Steyn. W.P.; Beer, M.S. 2000. Controlled atmosphere (C.A.) as a postharvest treatment against fruit flies in mangoes. In: South African Mango Growers' Association Yearbook, Vol. 20: 147-149.

Guevara, J.C., Yahia, E.M., De la Fuente, E.B. 2001. Modified atmosphere packaging of prickly pear cactus stems (*Opuntia* spp.). Food Sci. and Technol. 34(7): 445-451.

Gutiérrez S.R. 1989. Introducción al Método Científico. 4ª Ed. Esfinge. México. pp. 179-223.

Haffner, K. Rosenfeld, H.J., Skrede, G. y Wang, L. 2002. Quality of red raspberry *Rubus idaeus* L. cultivars after storage in controlled and normal atmospheres. In: Postharvest Biology and Technology 24(3): 279-289.

Hardenburg, R.E., Watada, A.E., y Wang, C.Y. 1986. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. In: United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Agriculture Handbook No. 66. 130p.

Harrison, C.M. y Harvey, J.M. 1973. Quality and decay of California strawberries stored in CO<sub>2</sub> enriched atmospheres. Plant Dis.Repr. 57: 44-46.

Harvey, J.M., Couey, H.M., Harris, C.M., y Porter, F.M. 1965. Air transport of California strawberries. Factors affecting market quality in summer shipments. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. pp1.

- Harvey, J.M. 1977. In-transit atmosphere modification – effects on quality of fruits and vegetables. In: Dewey, D.H. (Ed.). *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Dept. of Horticulture. Horticultural Report No. 28. Michigan State University. East Lansing, Michigan. U.S.A. pp. 71-78.
- Hatton, T.T., y Cubbedge, R.H. 1977. Status of controlled atmosphere storage research of citrus fruits. In: Dewey, D.H. (Ed.). *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Dept. of Horticulture. Horticultural Report No. 28. Michigan State University. East Lansing, Michigan, U.S.A. pp. 250-259.
- Hintze, J. 2004. *NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical Systems*, Kaysville, Utah, U.S.A. 100 pp.
- Huber, R. 2005. *The Huberlab HPLC Manual*. Department of Biological Sciences. Bowling Green State University. 50 pp.
- Hulme, A.C. 1956. Carbon dioxide injury and the presence of succinic acid in apples. *Nature* 178(4526): 218-219.
- Isenberg, F.M.R. 1979. Controlled atmosphere storage of vegetables. *Hort. Rev.* 1: 337-387.
- Jackson, M.B., Herman, B., y Goodenough, A. 1982. An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. *Plant Cell and Env.* 5:163-172.
- Kader, A.A. 1985. An overview of the physiological and biochemical basis of C.A. effects on fresh horticultural crops. In: Blakenship, S.M. (Ed.). *Proceedings of*

- the Fourth National Controlled Atmosphere Research Conference. Department of Horticultural Science. N. Carolina. U.S.A. Horticultural Report No. 126. pp1-9.
- Kader, A.A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Tech.* 40(5): 99-104.
- Kader, A.A., y Morris, L.L. 1977. Relative tolerance of fruits and vegetables to elevated CO<sub>2</sub> and reduced O<sub>2</sub> levels. In: Dewey, D.H. (Ed.). Department of Horticulture. Report No. 28. Michigan State University. East Lansing, Mich. U.S.A. pp. 260-276.
- Kader, A.A., Zagory, D., y Kerbel, E.L. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition* 28(1): 1-30.
- Kanellis, A. y Solomos, T. 1985. The effect of low oxygen on the activities of pectinmethylesterase and acid phosphatase during the course of ripening of bananas. In: Blakeship, S. (Ed.). *Controlled Atmospheres for Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities. Proceedings of the Fourth National Controlled Atmosphere Research Conference.* Department of Horticultural Science. North Carolina State University. U.S.A. pp. 20-26.
- Kays, S.J. 1991. Metabolic processes in harvested products. In: *Postharvest Physiology of Perishable Plant Products.* Chapter 3. Ed. AVI, U.S.A. pp 7-14; 75-95.
- Ke, D., Van Gorsel, H., y Kader, A.A. 1990. Physiological and quality responses of 'Bartlett' pears to reduced O<sub>2</sub> and enhanced CO<sub>2</sub> levels and storage temperature. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115(3): 435-439.

- Ke, D., Goldstein, L., O'Mahony, M., y Kader, A.A. 1991a. Effects of short term exposure to low O<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub> atmospheres on quality attributes of strawberries. *J. Food Sci.* 56(1): 50-54.
- Ke, D., Rodríguez-Sinobas, L., y Kader, A.A. 1991b. Physiology and prediction of fruit tolerance to low-oxygen atmospheres. *J. Am. Soc. Hort Sci.* 116(2): 253-260.
- Kenefick, D.G. 1963. Formation and elimination of ethanol in sugar beet roots. *Plant Physiol.* 38: 434-439.
- Kennedy, R.A., Rumpho, M.E., y Fox, T.C. 1992. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.* 100: 1-6.
- Kerbel, E.L. 1990. Respiratory and Glycolitic response of suspension-cultured 'Passe Crassane' pear fruit cells to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115(1): 111-114.
- Kidd, F.D., and C. West. 1927. Gas storage of fruit. Great Britain, Dept. of Science and Industry Research Food Investigation. Special Report #30. pp. 1-5.
- Kidd, F.D., and C. West. 1930. Physiology of fruit. I. Changes in the respiratory activity of apples during their senescence at different temperatures. In: *Proc. Roy. Soc. London.* Vol.106: 93.
- Kimmerer, T.W. y Kozlowski, T.T. 1982. Ethylene, ethane, acetaldehyde and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiol.* 69: 840-847.
- Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. 2000. Métodos Instrumentales. En: *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. Cap. 3. 2a. Ed. en español. C.E.C.S.A. México. pp. 61-62.

- Kiyosawa, K. 1975. Studies on the effects of alcohols on membrane water permeability of *Nitella*. *Protoplasma* 86: 243-252.
- Koobs, D.H. 1972. Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science* 178: 127-133.
- Kruger, N.J. 1990. Carbohydrate synthesis and degradation. In: Dennis, D.T., Turpin, D.H. (eds.) *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Cap.5. sección II. Cytosolic Carbon Metabolism. Ed. Longman Scientific & Technical – John Wiley & Sons Inc. New York, U.S.A. pp. 87-89.
- Kubo, Y., Inaba, A., y Nakamura, R. 1989. Effects of high CO<sub>2</sub> on respiration in various horticultural crops. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 58(3): 731-736.
- Kubo, Y., Inaba, A., y Nakamura, R. 1990. Respiration and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in various harvested crops held in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115(6): 975-978.
- Kupferman, E. 2001. Controlled atmosphere storage of apples and pears. In: *Postharvest Information Network*. Washington State University. Tree Fruit Research and Extension Center. pp.1-8.
- Lakshminarayana, S. y Subramanyam, H. 1970. CO<sub>2</sub> injury and fermentation decarboxylation in mango fruit at low temperature storage. *J. Food Sci. and Technol.* 7: 148-152.
- Laszlo, A. y Lawrence, P. 1983. Parallel induction and synthesis of PDC and ADH in anoxic maize roots. In: *Mol. Gen. Genet.* Vol. 192. pp.110-117.
- Lau, O.L. 1985. Storage responses of four apple cultivars to low-O<sub>2</sub> atmospheres. In: *Blakenship, S.M. (Ed.). Controlled Atmospheres for Storage and Transport of*

- Perishable Horticultural Commodities. Paper presented on the Proceedings of the Fourth National Controlled Atmospheres Research Conference, Raleigh, North Carolina. Department of Horticultural Science N. Carolina State University. U.S.A. Horticultural Report No. 126. pp. 43-56.
- Lebermann, K.W., Nelson, A.I., y Steinberg, M.P. 1968. Postharvest changes of broccoli stored in modified atmospheres. *Food Technol.* 22: 490-493.
- Leblová, S., Sinecká E., Vanicková, V. 1974. Pyruvate metabolism in germinating seeds during natural anaerobiosis. *Biologia Plantarum* 16(6): 406-411.
- Lee, S.P., Chen, P.M., Chen, T.H.H., Varga, D.M., y Mielke, E.A. 1990. Differences of biochemical components between the skin tissues of normal and black-speckled 'd'Anjou pears after prolonged low-oxygen storage. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115(5): 784-788.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 1995. PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA. 2a. ed. Omega S.A. Barcelona, España. pp 99-101.
- Lichter, A., Yochanan, Z., Sonogo, L., Orit D., Kaplunov, T., Sarig, P., Ben Arie, R. 2002. Ethanol controls decay of table grapes. In: *Postharvest Biology and Technology* 24(3): 301-308.
- Lipton, W.J. 1977. Toward an explanation of disorders of vegetables induced by high CO<sub>2</sub> or low O<sub>2</sub>? In: Dewey, D.H. (Ed.) *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Second National Controlled Atmosphere Conference. Michigan State University. Horticultural Report. No. 28: 137-141.
- Lipton, W.J. 1987. Carbon dioxide-induced injury of romaine lettuce stored in controlled atmospheres. *HortSci.* 22(3): 461-463.

- Lipton, W.J. y Harris, C.M. 1974. Controlled atmosphere effects on the market quality of stored broccoli (*Brassica oleracea* L. Italica group). J. Am. Soc. Hort. Sci. 99(3): 200-205.
- Liu, F.W. 1992. Sistemas de almacenamiento para productos hortofrutícolas. En: Yahia E.M., Higuera C. I. (eds.) Fisiología y Tecnología Postcosecha de Productos Hortícolas. Ed. Limusa, México. pp. 103-117.
- Lougheed, E.C., 1987. Interactions of oxygen, carbon dioxide, temperature and ethylene that may induce injuries in vegetables. HortSci. 22(5): 791-794.
- Lugg, J.R. 1977. The TransFRESH system for transportation of perishables. In: Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities. Dewey D.H. (Ed.). Department of Horticulture. Report No. 28. Michigan State Univ. East Lansing, Mich., U.S.A. pp. 70-75.
- Manual de Operaciones del Integrador Varian 4270, 1983 Sección 3, pp 18-19.
- Magness, J.R. 1920. Composition of gases in intercellular spaces of apples and potatoes. Bot. Gaz. 70: 308-316.
- Matile, PH., Moor, H. y Robinow, C.F. 1969. Yeast cytology In: Rose A.H. y Harrison, J.S. (eds.) Biology of Yeasts. Vol. 1. The Yeasts. Cap. 6. Academic Press. Inglaterra. pp. 267.
- Mencarelli, F. y Savarese, P. 1991. Ripening of kiwifruit exposed to ethanol and acetaldehyde vapors. Hort Sci. 26(5): 566-569.
- Miernyk, J.A. 1990. Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. In: Dennis, D.T. y Turpin, D. H. (Eds.). Plant Physiology,

- Biochemistry and Molecular Biology. Cap. 6. Longman, New York. U.S.A. pp. 90-91.
- Miller, E.V. y Dowd, O.J. 1936. Effects of carbon dioxide on the carbohydrates and acidity of fruits and vegetables in storage. *J. Ag. Res.*, Washington, D.C. 53: 1.
- Miller, G.W. y Evans, H.J. 1956. Inhibition of plant cytochrome oxidase by bicarbonate. *Nature* 178: 974-976.
- Millipore®. 2000-2001. Catálogo de Laboratorio Millipore. México. pp. 30.
- Mitz, M.A. 1979. CO<sub>2</sub> biodynamics: a new concept of cellular control: *J. Theor. Biol.* 80: 537-551.
- Morris, J.G. 1987. FISICOQUÍMICA PARA BIÓLOGOS. 2<sup>a</sup>. Ed. REPLA, S.A. México. pp.33-34, 60-61.
- Morris, J.R., Nelson, G.S., Cawthon D.L., y Buescher R.W. 1979. Acetaldehyde effects on postharvest quality of machine-harvested strawberries. *Arkansas Farm Research*. Vol. 28, No. 3. pp 10.
- Nandini-Kishore, S.G., Mattor, S.M., Martin, C.E., y Thompson, G.A. Jr. 1979. Membrane changes during growth of tetrahymena in the presence of ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*. 551: 315-327.
- Nanos, G.D. y Mitchell, F.G. 1991. Carbon dioxide injury and flesh softening following high-temperature conditioning in peaches. *Hort. Sci.* 26(5): 562-563.
- Norman, S.M. y Craft, C.C. 1971. Production of ethanol, acetaldehyde, and methanol by intact oranges during and after nitrogen storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96(4): 464-467.

- O'Mahony M. 1986. The Mann-Whitney U test. In: Additional Nonparametric Tests. Sensory Evaluation of Food. Statistical Methods and Procedures. Chapter 16. Ed. Marcel Dekker Inc. New York U.S.A. pp. 309-315.
- Ortega-Zaleta, D. y Yahia E.M. 2000. Tolerance and quality of mango fruit exposed to controlled atmospheres at high temperatures. In: Postharvest Biology and Technology Vol. 20(2) pp. 195-201.
- Öz, A.T., Özelkök I.S., y Albayrak B. 2005. Sugar and tannin content changes in persimmon fruit during artificial ripening with dry ice. In: Mencarelli F. y Tonutti P. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Postharvest Symposium. ISHS Acta Horticulturae 682. pp. 987-992.
- Pal, R.K. y Buescher, R.W. 1993. Respiration and ethylene evolution of certain fruits and vegetables in response to carbon dioxide in controlled atmosphere storage. J. Food Sci. Technol. 30(1): 29-32.
- Palmer, T. 1991. An introduction to bioenergetics, catalysis and kinetics, In: Understanding Enzymes. Chapters 6, 10, and 11. 3<sup>rd</sup> Ed. Ellis Horwood. New York, U.S.A. pp. 78-81; 111-112; 221-222.
- Parés I.F.R. y Juárez G. A. 1997. Efecto Pasteur. En: Bioquímica de los Microorganismos. Parte C: Productos Finales del Catabolismo. Cap. 4: Etanol. Ed. Reverté, S.A. México. pp. 43-44.
- Patterson, M.E. y Nichols, W.C. 1988. Metabolic response of 'Delicious' apples to carbon dioxide in anoxic and low-oxygen environments. HortSci. 23(5): 866-868.

- Pelayo, Z.C., Ebeler S.E., Kader, A.A. 2003. Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5°C in air or air + 20kPa CO<sub>2</sub>. *Postharvest Biology and Technology*. 27: 171-183.
- Perata P. y Alpi, A. 1991. Ethanol-induced injuries to carrot cells. The role of acetaldehyde. *Plant Physiol*. 95: 748-752.
- Perata, P., Alpi, A., y LoSchavo, F. 1986. Influence of ethanol on plant cells and tissues. *J. Plant Physiol*. 95: 748-752.
- Pesis, E. y Ben-Arie, R. 1984. Involvement of acetaldehyde and ethanol accumulation during induced deastringency of persimmon fruits. *J. Food Sci*. 49: 896-899.
- Petracek, P.D., Joles, D.W., Shirazi A., y Cameron, A.C. 2002. Modified atmosphere packaging of sweet cherry (*Prunus avium* L., ev. 'Sams') fruit: metabolic responses to oxygen, carbon dioxide, and temperature. In: *Postharvest Biology and Technology* 24(3): 259-270. Elsevier Science B.V.
- Piña-Dumoulin, G., Saucedo U.V.C, Ayala, E.V., y Muratalla, L.A. 2001. Atmósferas controladas para combatir daños postcosecha en zarzamora (*Rubus sp.*) En: *Rev. Fac. Agron. Chapingo (LUZ)*. México. 18: 87-105.
- Prange, R.K., DeLong J.M. y Harrison, P.A. 2005. Quality management through respiration control: Is there a relationship between lowest acceptable respiration, chlorophyll fluorescence and cytoplasmic acidosis? En: Mencarelli F. y Tonutti P. *Proceedings of the Fifth International Postharvest Symposium*. Vol. 2. *Acta Horticulturae* No. 682. pp. 823-830.
- Ranson, S.L. 1953. Zymosis and acid metabolism in higher plants. *Nature* 172: 252-253.

- Ranson, S.L., Walker, D.A., y Clarke, I.D. 1957. The inhibition of succinic oxidase by high CO<sub>2</sub> concentrations. Proceedings of the Biochemistry Society. Biochem. J. (66): 57pp.
- Rattanapanone, N., Lee Y., Wu. T., y Watada, A.E. 2001. Quality and microbial changes of fresh-cut mango cubes held in controlled atmosphere. In: HortScience 36(6): 1091-1095.
- Richter, G. 1972.FISIOLOGÍA DEL METABOLISMO DE LAS PLANTAS. Ed. C.E.C.S.A, México. pp. 248-255.
- Roberts, K., Haddad, P.R., y Jackson P.E. 1994. PRINCIPLES AND PRACTICE OF MODERN CHROMATOGRAPHIC METHODS. Academic Press, Londres. pp. 130-145.
- Roberts, J.K.M., Ray, P.M., Wade-Jardetzky N., y Jardetzky O. 1981. Extent of intracellular pH changes during H<sup>+</sup> extrusion by maize root tip cells. Planta 152:74-78.
- Roberts, J.K.M, Callis, J., Jardetzky, O., Walbot, V., y Freeling, M. 1984a. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6029-6033.
- Roberts. J.K.M., Callis J., Wemmer D., Walbot V., y Jardezky O. 1984b. Mechansim of cytoplasmic pH regulation in hypoxia maize root tips and its role in survival under hypoxia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 3379-3383.
- Rounds, M.A., Gregory J.F., III. 1994. High-Performance Liquid Chromatography. In: Nielsen S.S. Introduction to the Chemical Analysis of Foods. Cap. 29. Ed. Jones and Bartlett Publishers. Inglaterra. pp.425-438.

Ryall, A.L. y Lipton, W.J. 1979. Handling, transportation and storage of fruits and vegetables. Vol. 1: Vegetables and melons. 2a ed. AVI. U.S.A. pp. 300-306.

Ryall, A.L., y Pentzer W.T. 1979. Handling, Transportation and Storage of Fruits and Vegetables. Vol. 2: Fruits and tree nuts. Second ed. AVI. U.S.A pp 375-402.

Sadler, G.O. 1998. Chemical composition and characteristics of foods. In: Nielsen S.S. (ed). Introduction to the Chemical Analysis of Foods. Cap. 11 Purdue University. Jones and Bartlett Publishers International. Inglaterra. pp 83-88.

Sankat C.K. y Basanta A. 1997. Controlled atmosphere storage of the pomeroac. In: International Controlled Atmosphere Research Conference. University of California, Davies. U.S.A. pp .250-258.

SAS Institute 2005. SAS User's Guide: Statistics, Version 5. SAS Institute, Inc. Cary, N.C.

Senser F. y Scherz H. (compiladores) 1991. Tablas de Composición de Alimentos. El Pequeño "Souci-Fachmann-Kraut". Edición del Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching Bei Manchen. Ed. Acribia, S.A. España. pp. 305 y 372.

Sharples, R.O. 1989. CLASSICAL PAPERS IN HORTICULTURAL SCIENCE. Ed. Prentice Hall. New Jersey. U.S.A. pp. 213-219.

Shaw, G.W. y Kattan A.A. 1971. Development of experimental C.A. generator. Ark. Farm Res. 20(6): 3.

- Shewfelt, R.L. 1993. Stress physiology: a cellular approach to quality. In: Shewfelt, R.L. and Prussia, S.E. (eds.). Postharvest Handling. A Systems Approach. Cap. 12. Academic Press. Londres, Ing. pp. 257-276.
- Siegel, S. y Castellan N.J. 1998. Estadística No Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta. 4ª ed. Trillas. México. pp143.
- Singh, B., Littlefield, N.A., and Salunkhe D.K. 1970. Effects of controlled atmosphere (CA) storage on amino acids, organic acids, sugars, and rate of respiration of 'Lambert' sweet cherry fruit. J. Am. Soc. Hort. Sci. 95(4): 458-461.
- Siriphanich, J. y Kader A.A. 1985. Effects of CO<sub>2</sub> on total phenolics, phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in lettuce tissue. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110(2): 249-253.
- Siriphanich, J. y Kader A.A. 1986. Changes in Cytoplasmic and vaculoar pH in harvested lettuce tissue as influenced by CO<sub>2</sub>. J. Am. Soc. Hort. Sci. 111(1): 73-77.
- Skoog, D.A. y Leary J.J. 1996. Introducción a la espectroscopía de absorción molecular ultravioleta/visible y de infrarrojo cercano. En: Análisis Instrumental. 4ª. Ed McGraw-Hill. México. pp. 142-147.
- Smagula, J.M. y Bramlage W.J. 1977a. Acetaldehyde accumulation: is it a cause of physiological deterioration of fruits? Hort Sci. 12(3): 318-320.
- Smagula, J.M. y Bramlage W.J. 1977b. Measurement of acetaldehyde in senescing apple fruits. J. Am. Soc. Hort. Sci. 102(3): 318-320.
- Smith, W.H. 1957. Accumulation of ethyl alcohol and acetaldehyde in black currants kept in high concentrations of carbon dioxide. Nature 179: 876.

- Smith, W.H. 1963. The use of carbon dioxide in the transport and storage of fruits and vegetables. In: Chichester, C.O., Mrak E.M., Stewart G.F. (Ed.). *Advances in Food Research* 12: 114-116.
- Smith, F.A. y Raven J.A: 1979. Intracellular pH and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 289-311.
- Smock, R.M., 1979. Controlled atmosphere storage of fruits. *Hort. Rev.* 1: 301-336.
- Sommer, N.F. 1985. Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 7: 331-339.
- Spalding, D.H. 1977. Current recommendations of atmospheres for transport and storage of tropical fruits. In: Dewey. D.H. (Ed.). *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable and Agricultural Commodities*. Horticultural Report No. 28. Michigan State University. East Lansing, Mich. U.S.A. pp. 242-247.
- Speirs, J., Correll, R. y Chain, P. 2002. Relationship between ADH activity, ripeness and softness in six tomato cultivars. *Scientia Horticulturae.* 93: 137-142.
- Stewart, J.K., Aharoni, Y., Hartsell P.L., e Young D.K. 1980. Symptoms of acetaldehyde injury on head lettuce. *Hort. Sci.* 15(2): 148-149.
- Stewart. J.K., y Uota, M. 1971. Carbon dioxide injury and market quality of lettuce held in controlled atmospheres. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 96: 27-30.
- Stoll, K., Kocher, V., Gerber, H., y Bussman, A. 1958. Untersuchungen an lageripfeln, mitt. Gebiete Lebensm. U. Hyg. 49: 172.

- Thomas, M. 1925. The controlling influence of carbon dioxide. V. A quantitative study of the production of ethyl alcohol and acetaldehyde by cells of the higher plants in relation to concentration of oxygen and carbon dioxide. *Biochem. J.* 19: 927-947.
- Thompson, A.K., 1998. Current use of controlled atmosphere storage for fruits and vegetables. In: *Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables*. Chapter 2. Ed. CAB International. New York, U.S.A. pp 15-108.
- Thornton, N.C. 1937. Carbon dioxide storage. X. The effect of carbon dioxide on the ascorbic acid content, respiration and pH of asparagus tissue. *Contribs. Boyce Thompson Inst.* 9: 137.
- Tian, S., Xu, Y., Jiang, A. y Gong, Q. 2002. Physiological and quality responses of longan fruit to high O<sub>2</sub> or high CO<sub>2</sub> atmospheres in storage. In: *Postharvest Biology and Technology* 24(3): 335-340. Elsevier Science B.V.
- Tonini, G., Caccioni, D. y Ceroni, G. 1993. CA storage of stone fruits: effects on diseases and disorders. In: *Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables. Proceedings of a Workshop*. 22-23 abril. Milán, Italia. pp 95-105.
- Ulrich, R. 1970. Organic Acids. In: Hulme A.C. (ed) *THE BIOCHEMISTRY OF FRUITS AND THEIR PRODUCTS*. Vol. 1. Cap. 4. Ed. Academic Press. Londres. pp.89-115.
- Varro, M.T., Traducido por Owens en 1800 D.C. *THE THREE BOOKS OF M. TORENTINA VARRO CONCERNING AGRICULTURE*. T. Owen (trans.) Oxford. 257 pp.
- Vartapetian, B.B., Bazier, R., y Costers, C. 1978. Lipids in rice seedlings under anaerobic and aerobic conditions. In: Hook D.D. y Crawford R.M.M. (Eds.).

- Plant Life in Anaerobic Environments. Cap. 18. Ann Arbor Science Publishers Inc. Ann Arbor, Mich. U.S.A. pp 539-548.
- Wager, H.G. 1974a. The effect of subjecting peas to air enriched with carbon dioxide. I. The path of gaseous diffusion, the content of CO<sub>2</sub> and the buffering of the tissue. *J. Exp. Bot.* 25(85): 330-337.
- Wager, H.G. 1974b. The effect of subjecting peas to air enriched with carbon dioxide. II. Respiration and the metabolism of the major acids. *J. Exp. Bot.* 25(85): 338-351.
- Wallick, K. y Zinnen, T.M. 1990. Basil chlorosis: a physiological disorder in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *Plant Disease* 74(2): 171-173.
- Wang, C.Y. 1977. Effect of CO<sub>2</sub> treatment on storage and shelf life of sweet peppers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 102(6): 808-812.
- Wang, T. 1992. Organic Acids in Peaches and their Changes with Fruit Ripening and Chilling Injury. M.S. thesis. University of Arkansas. 69 pp.
- Weichmann, J. 1977a. Physiological response of root crops to controlled atmospheres. In: Dewey, D.H. (Ed.). *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Department of Horticulture. Horticultural Report No. 28. Michigan State University. East Lansing, Mich. U.S.A. pp. 122-136.
- Weichmann, J. 1977b. CA storage of root crops. In: Dewey, D.H. (Ed.). *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Department of Horticulture. Horticultural Report No. 28. Michigan State University. East Lansing, Mich. U.S.A. pp 282-293.

- Weichmann, J. 1986. The effect of controlled-atmosphere storage on the sensory and nutritional quality of fruits and vegetables. Hort. Rev. 8: 101-127.
- Wills, R.B.H., McGlasson, W.B., Graham, D., Lee, T.H. y Hall E.G. 1989. Physiology and biochemistry of fruits and vegetables. In: Postharvest.. An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables. Cap. 3. 3ª ed. BSP Professional Books. pp. 22-37.
- Wollin, A.S., Little, C.R., y Packer J.S. 1985. Dynamic control of storage atmospheres. In: Blakeship. S. (Ed.). Controlled Atmospheres for Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities Research Conference. Department of Horticultural Science. North Carolina State University. U.S.A. Horticultural Report No. 126 pp.308-315.
- Yahia, E.M. 1992. Tecnología de atmósferas modificadas y controladas. En: Bósquez M.E., Saucedo V.C. (eds.). Memorias de la I Reunión Latinoamericana de Tecnología Postcosecha. U.A.M. Iztapalapa. México. pp 117-135.
- Yahia, E.M. 1993. Tecnología de atmósferas modificadas y controladas. En: Bósquez M.E., Saucedo V. C. (eds.). Memorias de la I Reunión Latinoamericana de Tecnología Postcosecha. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Nov. 30 – Dic. 4 de 1992. México. pp. 117-125.
- Yahia, E.M. 1997. Modified /Controlled Atmospheres for Mango (*Mangifera indica* L.). Controlled Atmosphere Research Conference. Julio 13-18. University of California, Davis. U.S.A. pp. 110-125.
- Yahia E.M. 1998. Modified and Controlled Atmospheres for Tropical Fruits . Hort. Rev. 22: 123-183.

- Yahia E.M y Carrillo-López A. 1993. Responses of avocado fruit to insecticidal O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> atmospheres. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 26: 307-311.
- Yahia, E.M. y Hernández, M.T. 1993. Tolerance and responses of harvested mango insecticidal low-oxygen atmospheres. *HortSci.* 28(10) pp 1031-1033.
- Yahia, E.M. y Ortega-Zaleta, D. 2000. Mortality of eggs and third instar larvae of *Anastrepha Ludens* and *A. obliqua* with insecticidal controlled atmospheres at high temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 20(3) pp.295-302.
- Yahia, E.M., Rivera M., y Hernández O. 1992. Responses of papaya to short-term insecticidal oxygen atmospheres. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 96-99.
- Yáñez, L. L., Mercado P. E., Yahia K. E., y Armella M. A. 2001. Ethanol accumulation patterns in different horticultural commodities in response to enriched CO<sub>2</sub> atmospheres. In: *Acta horticultrae* 553: 657-661.
- Youssef, S.E. y Mitcham E.J. 1997. Hot water and controlled atmosphere storage for controlling brown rot of peaches and apricots. *Egyptian J. Appl. Sci.* 12: 96-114.
- Zagory, D. y Kader, A. 1988. Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technol.* 42(9): 70-74, 76-77.
- Zemlianukhin, A.A. e Ivanov B.F. 1978. Metabolism of organic acids of plants in the conditions of hypoxia. In: *Plant Life in Anaerobic Environments*. Chapter 8. Hook D.D. and Crawford R.M.M. (Ed.). Ann Arbor Science Publishers Inc. Ann Arbor, Mich. U.S.A. pp. 203-209.

SITIOS CONSULTADOS EN LA RED

<http://scifun.chem.wisc.edu/CHEMWEEK/CO2/CO2.html> 2006.

[www.millipore.com/membrane](http://www.millipore.com/membrane). 2000-2001.

[WWW.NCSS.com](http://WWW.NCSS.com) 2006.

<http://postharvest.tfrec.wsu.edu/EMK2000C.pdf>. 2001.

## **APÉNDICE I**

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y  
RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES  
DEL EFECTO DE LAS ATMÓSFERAS RICAS EN CO<sub>2</sub>  
EN LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS DEL CICLO DE KREBS  
EN PEPINO Y KIWI

**Analysis of Variance Report**

Page/Date/Time 1 12/03/2006 09:33:22 p.m.

Database

Response Pepino Succinico

**Expected Mean Squares Section**

Source Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: Trat	1	Yes	S	S+bsA
B: Horas	2	Yes	S	S+asB
AB	2	Yes	S	S+sAB
S	12	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Trat	1	1.552211	1.552211	1.93	0.190185	0.248529
B: Horas	2	3.913896	1.956948	2.43	0.129903	0.395434
AB	2	1.142553	0.5712766	0.71	0.511326	0.142762
S	12	9.65977	0.8049809			
Total (Adjusted)	17	16.26843				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Means and Effects Section**

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	18	5.076039		5.076039
A: Trat				
CO2	9	5.369695	0.2990691	0.2936561
testigo	9	4.782382	0.2990691	-0.2936561
B: Horas				
0	6	5.635583	0.3662833	0.5595446
24	6	5.098492	0.3662833	2.245335E-02
48	6	4.49404	0.3662833	-0.581998
AB: Trat,Horas				
CO2,0	3	6.284926	0.5180029	0.3556872
CO2,24	3	5.232409	0.5180029	-0.1597395
CO2,48	3	4.591749	0.5180029	-0.1959476
testigo,0	3	4.98624	0.5180029	-0.3556872
testigo,24	3	4.964575	0.5180029	0.1597395
testigo,48	3	4.396332	0.5180029	0.1959476

**Analysis of Variance Report**

Page/Date/Time 3 12/03/2006 09:33:22 p.m.  
 Database  
 Response Pepino Citrico

**Expected Mean Squares Section**

Source Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: Trat	1	Yes	S	S+bsA
B: Horas	2	Yes	S	S+asB
AB	2	Yes	S	S+sAB
S	12	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Trat	1	0.1483373	0.1483373	0.07	0.798663	0.056659
B: Horas	2	0.9655064	0.4827532	0.22	0.804622	0.077122
AB	2	4.630484	2.315242	1.06	0.376240	0.193394
S	12	26.16919	2.180766			
Total (Adjusted)	17	31.91352				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Means and Effects Section**

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	18	2.393884		2.393884
A: Trat				
CO2	9	2.484664	0.4922472	9.077973E-02
testigo	9	2.303104	0.4922472	-9.077973E-
02				
B: Horas				
0	6	2.098419	0.6028772	-0.2954646
24	6	2.419206	0.6028772	2.532161E-02
48	6	2.664027	0.6028772	0.270143
AB: Trat,Horas				
CO2,0	3	2.212382	0.8525971	2.318237E-02
CO2,24	3	3.119257	0.8525971	0.6092716
CO2,48	3	2.122353	0.8525971	-0.632454
testigo,0	3	1.984457	0.8525971	-2.318237E-
02				
testigo,24	3	1.719154	0.8525971	-0.6092716
testigo,48	3	3.205701	0.8525971	0.632454

### Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 5 12/03/2006 09:33:22 p.m.

Database

Response Pepino Málico

#### Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: Trat		1	Yes	S	S+bsA
B: Horas		2	Yes	S	S+asB
AB		2	Yes	S	S+sAB
S		12	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

#### Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Trat		1	2.705878	2.705878	1.54	0.237797	0.208405
B: Horas		2	1.54645	0.7732249	0.44	0.653334	0.105816
AB		2	9.217606E-02	4.608803E-02	0.03	0.974105	0.053115
S		12	21.03397	1.752831			
Total (Adjusted)		17	25.37848				
Total		18					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	18	5.430477		5.430477
A: Trat				
CO2	9	5.818197	0.4413151	0.3877197
testigo	9	5.042757	0.4413151	-0.3877197
B: Horas				
0	6	5.69855	0.5404984	0.268073
24	6	5.022627	0.5404984	-0.4078493
48	6	5.570253	0.5404984	0.1397763
AB: Trat,Horas				
CO2,0	3	6.004131	0.7643802	-8.213854E-
02				
CO2,24	3	5.502615	0.7643802	9.226774E-02
CO2,48	3	5.947844	0.7643802	-0.0101292
testigo,0	3	5.392969	0.7643802	8.213854E-02
testigo,24	3	4.54264	0.7643802	-9.226774E-
02				
testigo,48	3	5.192663	0.7643802	0.0101292

**Analysis of Variance Report**

Page/Date/Time 7 12/03/2006 09:33:22 p.m.

Database

Response Kiwi Succinico

**Expected Mean Squares Section**

Source	Term	DF	Term	Denominator	Expected Mean Square
			Fixed?	Term	
A: Trat		1	Yes	S	S+bsA
B: Horas		2	Yes	S	S+asB
AB		2	Yes	S	S+sAB
S		12	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

**Analysis of Variance Table**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term		(Alpha=0.05)				
A: Trat	1	1.552211	1.552211	1.93	0.190185	0.248529
B: Horas	2	3.913896	1.956948	2.43	0.129903	0.395434
AB	2	1.142553	0.5712766	0.71	0.511326	0.142762
S	12	9.65977	0.8049809			
Total (Adjusted)	17	16.26843				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Means and Effects Section**

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	18	5.076039		5.076039
A: Trat				
CO2	9	5.369695	0.2990691	0.2936561
testigo	9	4.782382	0.2990691	-0.2936561
B: Horas				
0	6	5.635583	0.3662833	0.5595446
24	6	5.098492	0.3662833	2.245335E-02
48	6	4.49404	0.3662833	-0.581998
AB: Trat,Horas				
CO2,0	3	6.284926	0.5180029	0.3556872
CO2,24	3	5.232409	0.5180029	-0.1597395
CO2,48	3	4.591749	0.5180029	-0.1959476
testigo,0	3	4.98624	0.5180029	-0.3556872
testigo,24	3	4.964575	0.5180029	0.1597395
testigo,48	3	4.396332	0.5180029	0.1959476

**Analysis of Variance Report**

Page/Date/Time 9 12/03/2006 09:33:22 p.m.

Database

Response Kiwi Málico

**Expected Mean Squares Section**

Source	Term	DF	Term	Denominator	Expected Mean Square
	Term		Fixed?	Term	
A: Trat		1	Yes	S	S+bsA
B: Horas		2	Yes	S	S+asB
AB		2	Yes	S	S+sAB
S		12	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

**Analysis of Variance Table**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term		(Alpha=0.05)				
A: Trat	1	2.705878	2.705878	1.54	0.237797	0.208405
B: Horas	2	1.54645	0.7732249	0.44	0.653334	0.105816
AB	2	9.217606E-02	4.608803E-02	0.03	0.974105	0.053115
S	12	21.03397	1.752831			
Total(Adjusted)	17	25.37848				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Means and Effects Section**

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	18	5.430477		5.430477
A: Trat				
CO2	9	5.818197	0.4413151	0.3877197
testigo	9	5.042757	0.4413151	-0.3877197
B: Horas				
0	6	5.69855	0.5404984	0.268073
24	6	5.022627	0.5404984	-0.4078493
48	6	5.570253	0.5404984	0.1397763
AB: Trat,Horas				
CO2,0	3	6.004131	0.7643802	-8.213854E-
02				
CO2,24	3	5.502615	0.7643802	9.226774E-02
CO2,48	3	5.947844	0.7643802	-0.0101292
testigo,0	3	5.392969	0.7643802	8.213854E-02
testigo,24	3	4.54264	0.7643802	-9.226774E-
02				
testigo,48	3	5.192663	0.7643802	0.0101292

## Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 11 12/03/2006 09:33:22 p.m.  
 Database  
 Response Kiwi Piruvico

## Expected Mean Squares Section

Source Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: Trat	1	Yes	S	S+bsA
B: Horas	2	Yes	S	S+asB
AB	2	Yes	S	S+sAB
S	0	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

## Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Trat	1	1.26933E-05	1.26933E-05			
B: Horas	2	7.564056E-04	3.782028E-04			
AB	2	7.246971E-03	3.623485E-03			
S	0	0				
Total (Adjusted)	5	8.016069E-03				
Total	6					

\* Term significant at alpha = 0.05

## Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	6	0.2875985		0.2875985
A: Trat				
CO2	3	0.2890529	0	1.454493E-03
testigo	3	0.286144	0	-1.454493E-
03				
B: Horas				
0	2	0.2717494	0	-0.015849
24	2	0.2946814	0	7.082926E-03
48	2	0.2963645	0	8.766077E-03
AB: Trat,Horas				
CO2,0	1	0.2717494	0	-1.454493E-
03				
CO2,24	1	0.2543172	0	-4.181868E-
02				
CO2,48	1	0.3410922	0	4.327317E-02
testigo,0	1	0.2717494	0	1.454493E-03
testigo,24	1	0.3350456	0	4.181868E-02
testigo,48	1	0.2516369	0	-4.327317E-
02				

### Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 13 12/03/2006 09:33:22 p.m.

Database

Response Kiwi citrico

#### Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: Trat		1	Yes	S	S+bsA
B: Horas		2	Yes	S	S+asB
AB		2	Yes	S	S+sAB
S		12	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

#### Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Trat		1	0.1483373	0.1483373	0.07	0.798663	0.056659
B: Horas		2	0.9655064	0.4827532	0.22	0.804622	0.077122
AB		2	4.630484	2.315242	1.06	0.376240	0.193394
S		12	26.16919	2.180766			
Total (Adjusted)		17	31.91352				
Total		18					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	18	2.393884		2.393884
A: Trat				
CO2	9	2.484664	0.4922472	9.077973E-02
testigo	9	2.303104	0.4922472	-9.077973E-
02				
B: Horas				
0	6	2.098419	0.6028772	-0.2954646
24	6	2.419206	0.6028772	2.532161E-02
48	6	2.664027	0.6028772	0.270143
AB: Trat,Horas				
CO2,0	3	2.212382	0.8525971	2.318237E-02
CO2,24	3	3.119257	0.8525971	0.6092716
CO2,48	3	2.122353	0.8525971	-0.632454
testigo,0	3	1.984457	0.8525971	-2.318237E-
02				
testigo,24	3	1.719154	0.8525971	-0.6092716
testigo,48	3	3.205701	0.8525971	0.632454

## **APÉNDICE II**

### **PUBLICACIONES**

## ETHANOL ACCUMULATION PATTERNS IN DIFFERENT HORTICULTURAL COMMODITIES IN RESPONSE TO ENRICHED CO<sub>2</sub> ATMOSPHERES

L.L. Yanez<sup>1</sup>, P.E. Mercado<sup>1</sup>, K.E. Yahia<sup>2</sup> and M. A. Armella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana. Apdo 55-535 Mexico 09340 D. F.

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico.

E-mail: lyanez @xanum.uam.mx.

**Keywords:** controlled atmospheres, CO<sub>2</sub> treatment, ethanol accumulation.

### Abstract

Our main objective was to determine whether the responses of several horticultural products to increased CO<sub>2</sub> levels in their storage atmospheres could be grouped by their ethanol accumulation patterns. Sixteen different products were exposed to air without CO<sub>2</sub> or containing 30% CO<sub>2</sub>. Ethanol concentration was measured by gas chromatography and sensory tests every 12h for 3 days. Three main accumulation patterns were distinguished by regression analysis: *linear*, steady accumulation throughout the experiment (e.g., cucumber); *positive curve*, very fast initial ethanol accumulation, followed by a plateau or even a decrease in ethanol content (e.g., citrus); and *negative curve*, very low or zero ethanol accumulation until a threshold was crossed, after which ethanol increased rapidly (e.g., apple). Patterns were confirmed by linear or quadratic regression analysis.

### 1. Introduction

Horticultural commodities are often grown far from their marketing centers or processing facilities and must be protected from postharvest deterioration and decay caused by microorganisms during transport and marketing. The introduction of high carbon dioxide levels (CO<sub>2</sub>) to the storage environment has been shown to decrease spoilage. It is important to understand the effects of high levels of CO<sub>2</sub> in stored horticultural produce because CO<sub>2</sub> is a product of respiration and its accumulation in the storage atmosphere may retard this physiological process (Kubo *et al.*, 1990). CO<sub>2</sub> does not leave any toxic residue in stored commodities (Yahia, 1998) and use of a CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere is a plausible option to control insect populations and delay senescence of perishable produce (Yahia, 1997). However, certain commodities are injured by high levels of CO<sub>2</sub>, through the development of physiological disorders or fermentation, that could lead to off-odors and flavors (Lipton, 1977) which render the produce unacceptable in the markets (Fernández-Trujillo, *et al.*, 1999). Therefore, understanding the effects of controlled atmospheres (CA) and modified atmospheres (MA) is important in applying them to new commodities.

Some studies of fruits such as citrus during CA storage have indicated that ethanol (ETOH) is the most altered volatile component (Davies *et al.*, 1969), therefore, the amount of ETOH produced in horticultural commodities may be a good index of their sensitivity to high levels of CO<sub>2</sub>.

Three different mathematical models might describe the patterns of ETOH accumulation within the fruits. The first and easiest is the "Linear model" in which the accumulation of ETOH proceeds at the same rate regardless of the time of storage and the existing ETOH concentration. Two curvilinear, or quadratic-fit models may describe different ways in which the rate of accumulation of ETOH varies during the first hours and afterwards: the one (QP) with a positive quadratic term describes initial rapid accumulation followed by saturation or metabolic diminution; the one (QN) with a negative quadratic term describes initial slow accumulation to a threshold level, followed

by a rapid increase.

The objective of the present study was to find out whether diverse horticultural commodities respond in the same way to CO<sub>2</sub>-enrichment of the storage atmosphere.

## 2. Materials and methods

Cucumbers, sugar beets, carrots, strawberries, peaches (Stage 6), oranges (Navel), limes (Mexicano), kiwifruits in two maturity stages, apples (Red Delicious), bananas (Stage 6), potatoes, tomatoes (Stage 5) and prickly pears were purchased from the main retail market of Mexico City.

At the laboratory, produce was randomly assigned to either 30% CO<sub>2</sub> in air (chosen because it would provide results in just 3 days) or air (control) treatments. Gas mixtures were obtained from a commercial provider (Praxair<sup>®</sup>) and verified by gas chromatography (GC). Commodities were individually measured and weighed, and five to seven specimens were placed in chambers with a continuous flow of the selected atmospheres, controlled at 100 ml/min (Buescher, 1979), at 7±1°C. At least three replicates were used.

Chambers were randomly assigned for sampling at each measurement time. Analyses were done twice daily for 3 days, i.e. 6 samples of each commodity. Each specimen was sliced, chopped into small pieces and homogenized. For ETOH determination a 10 g tissue sample (no peel or seeds) was homogenized in a 3M NaCl solution and placed in a water bath at 30°C for at least 15 min. A 2 ml sample of headspace gas was injected into a GC (Varian<sup>®</sup> 3700) with a 6-8-m capillary column at 35°C; FID was at 120°C; injection port was at 120°C; carrier gas (nitrogen) flow rate was 200-250 ml/min; split flow rate was 100 ml/min. Remaining pieces of commodities from each treatment (except for those that have to be cooked) were offered to a minimum of 10 non-trained panelists to determine taste differences between treatments.

Statistical analysis was performed with SAS software (V6.2). ETOH accumulation patterns in plant tissues were determined by means of quadratic or linear contrast after the ANOVA. Coefficients were obtained by regression analysis.

## 3. Results and discussion

Significant variability in ETOH levels was observed among the commodities, not only initially but also at the end of storage and in the accumulation process. Thus, potatoes and beets contained only traces, carrots less than 10 µl/l, tomatoes and bananas 15-30 µl/l, and cucumbers 50 µl/l. The general response to storage in air was linear (Table 1); exceptions were carrots and bananas with a QP trend, and lime and apple with QN. It has been suggested that internal CO<sub>2</sub> levels in plant tissues such as parenchyma, might come from the pentose phosphate pathway of the TCA cycle. Thus, CO<sub>2</sub> accumulates in some regions and may provide an internal microenvironment suitable for ETOH production and subsequent accumulation (Douce, 1985; Miernyk, 1990).

Most of the commodities showed a QP response to 30% CO<sub>2</sub>: ETOH accumulation was relatively slow for approximately the first 10 h and then drastically accelerated. However, cucumbers, strawberries, potatoes and red plums exhibited linear responses, and white grapes, oranges, lime and apples presented QN responses. Nine of the products changed their ETOH accumulation patterns when stored under CO<sub>2</sub> enrichment.

The responses of kiwifruit at two ripening stages (at 14° Brix and at 16° Brix), stored under 30% CO<sub>2</sub> differed from those in air only in the levels of accumulated ETOH during the storage period but not in the accumulation patterns: QP and linear, respectively (Yáñez, *et al.*, 1999). These results support the findings of Zemlianukhin *et al.* (1978) that gas diffusion is also influenced by aging of plant organs, and that their internal atmosphere is determined by the environmental composition and metabolic features of their cells.

Citrus responded to storage in 30% CO<sub>2</sub> in air with a rapid initial increase in ETOH accumulation followed by a gradual decrease – a QN pattern. The diminished ETOH accumulation might be due to metabolism and/or exudation of ETOH (Chirkova, 1978; Cossins, 1978). Cossins *et al.* (1963) found that labeled ETOH applied to some plant tissues was converted into organic acids, amino acids, lipids, sugars and CO<sub>2</sub> through established pathways within plant tissues. Thus, it would be interesting to conduct studies on accumulation of some of these compounds in relation to the decrease in ETOH levels observed in CO<sub>2</sub>-treated produce.

Fernández-Trujillo *et al.* (1999) found differences among strawberry cultivars in their fermentation responses to CO<sub>2</sub>, which they attributed to differential pyruvate decarboxylase (PDC) and/or alcohol dehydrogenase (ADH) isozyme activities and lowered pH resulting from carbonic acid formation. Also high levels of succinate have been found in stems, leaves and fruits of commodities tolerant to high levels of CO<sub>2</sub> (Hulme, 1956; Ke *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1998; Fernández-Trujillo *et al.*, 1999).

Some studies indicate that fermentation may not be as toxic to plant tissues as previously believed; it provides a mechanism for pyruvate oxidation and ATP production, although proportionally less than via the TCA cycle. Studies with roots during flooding indicate that ETOH production provides some mechanism of leakage of this compound to the soil medium (Fernández-Trujillo, *et al.*, 1999). There are also studies in which apples were treated with ETOH vapor to control scald, although the mechanism of action is unknown (Wang *et al.*, 1999).

#### References

- Buescher, R.W., 1979. Influence of carbon dioxide on postharvest ripening and deterioration of tomatoes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 82:212-215.
- Chirkova, T.V., 1978. Some regulatory mechanisms of plant adaptation to temporal anaerobiosis. In: *Plant Life in Anaerobic Environments*. Chapter 5. Hook D.D., Crawford, R.M.M. (eds.). Ann Arbor Sci. Pubs. Inc. U.S.A., pp. 137-154.
- Cossins, E.A., 1978. Ethanol metabolism in plants. In: *Plant Life in Anaerobic Environments*. Chapter 7. Hook, D.D. and Crawford R.M.M. (Eds.) Ann Arbor Sci. Pubs. Inc. U.S.A., pp. 169-202.
- Cossins, E.A., and Beevers, H., 1963. Ethanol metabolism in plant tissues. *Plant Physiol.*, 38:375-380.
- Davies, P.L. and Chace, W.G., Jr., 1969. Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. *Hort. Sci.*, 4:117-119.
- Douce, R., 1985. Mitochondrial oxidative activities in relation to *in vivo* metabolism. Chapter 4. In: *Mitochondria in Higher Plants*. Ed. Academic Press, Inc., U.S.A., pp. 227-232.
- Fernández-Trujillo, J.P., Nock, J.F., and Watkins, C.B., 1999. Fermentative metabolism and organic acid concentrations in fruit of selected strawberry cultivars with different tolerances to carbon dioxide. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124:696-701.
- Hulme, A.C., 1956. Carbon dioxide injury and the presence of succinic acid in apples. *Nature*: 178:218-219.
- Ke, D., Mateos, M., Siriphanich, C. and Kader, A., 1993. Carbon dioxide action on metabolism of organic and amino acids in crisphead lettuce. *Postharvest Biol. Technol.*, 3:235-247.
- Kubo, Y., Inaba, A., and Nakamura, R., 1990. Respiration and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in various harvested crops held in CO<sub>2</sub> enriched atmospheres. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 115:975-978.
- Lipton, W.J., 1977. Toward an explanation of disorders of vegetables induced by high CO<sub>2</sub> or low O<sub>2</sub>? In: *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Dewey D.H. (ed.). Second National Controlled Atmosphere Conference. Michigan State University. Hort. Report, 28:137-141.
- Miernyk, J.A., 1990. Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anaerobic

Citrus responded to storage in 30% CO<sub>2</sub> in air with a rapid initial increase in ETOH accumulation followed by a gradual decrease – a QN pattern. The diminished ETOH accumulation might be due to metabolism and/or exudation of ETOH (Chirkova, 1978; Cossins, 1978). Cossins *et al.* (1963) found that labeled ETOH applied to some plant tissues was converted into organic acids, amino acids, lipids, sugars and CO<sub>2</sub> through established pathways within plant tissues. Thus, it would be interesting to conduct studies on accumulation of some of these compounds in relation to the decrease in ETOH levels observed in CO<sub>2</sub>-treated produce.

Fernández-Trujillo *et al.* (1999) found differences among strawberry cultivars in their fermentation responses to CO<sub>2</sub>, which they attributed to differential pyruvate decarboxylase (PDC) and/or alcohol dehydrogenase (ADH) isozyme activities and lowered pH resulting from carbonic acid formation. Also high levels of succinate have been found in stems, leaves and fruits of commodities tolerant to high levels of CO<sub>2</sub> (Hulme, 1956; Ke *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1998; Fernández-Trujillo *et al.*, 1999).

Some studies indicate that fermentation may not be as toxic to plant tissues as previously believed; it provides a mechanism for pyruvate oxidation and ATP production, although proportionally less than via the TCA cycle. Studies with roots during flooding indicate that ETOH production provides some mechanism of leakage of this compound to the soil medium (Fernández-Trujillo, *et al.*, 1999). There are also studies in which apples were treated with ETOH vapor to control scald, although the mechanism of action is unknown (Wang *et al.*, 1999).

#### References

- Buescher, R.W., 1979. Influence of carbon dioxide on postharvest ripening and deterioration of tomatoes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 82:212-215.
- Chirkova, T.V., 1978. Some regulatory mechanisms of plant adaptation to temporal anaerobiosis. In: *Plant Life in Anaerobic Environments*. Chapter 5. Hook D.D., Crawford, R.M.M. (eds.). Ann Arbor Sci. Pubs. Inc. U.S.A., pp. 137-154.
- Cossins, E.A., 1978. Ethanol metabolism in plants. In: *Plant Life in Anaerobic Environments*. Chapter 7. Hook, D.D. and Crawford R.M.M. (Eds.) Ann Arbor Sci. Pubs. Inc. U.S.A., pp. 169-202.
- Cossins, E.A., and Beevers, H., 1963. Ethanol metabolism in plant tissues. *Plant Physiol.*, 38:375-380.
- Davies, P.L. and Chace, W.G., Jr., 1969. Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. *Hort. Sci.*, 4:117-119.
- Douce, R., 1985. Mitochondrial oxidative activities in relation to *in vivo* metabolism. Chapter 4. In: *Mitochondria in Higher Plants*. Ed. Academic Press, Inc., U.S.A., pp. 227-232.
- Fernández-Trujillo, J.P., Nock, J.F., and Watkins, C.B., 1999. Fermentative metabolism and organic acid concentrations in fruit of selected strawberry cultivars with different tolerances to carbon dioxide. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124:696-701.
- Hulme, A.C., 1956. Carbon dioxide injury and the presence of succinic acid in apples. *Nature*: 178:218-219.
- Ke, D., Mateos, M., Siriphanich, C. and Kader, A., 1993. Carbon dioxide action on metabolism of organic and amino acids in crisphead lettuce. *Postharvest Biol. Technol.*, 3:235-247.
- Kubo, Y., Inaba, A., and Nakamura, R., 1990. Respiration and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in various harvested crops held in CO<sub>2</sub> enriched atmospheres. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 115:975-978.
- Lipton, W.J., 1977. Toward an explanation of disorders of vegetables induced by high CO<sub>2</sub> or low O<sub>2</sub>? In: *Controlled Atmospheres for the Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Dewey D.H. (ed.). Second National Controlled Atmosphere Conference. Michigan State University. Hort. Report, 28:137-141.
- Miernyk, J.A., 1990. Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anaerobic

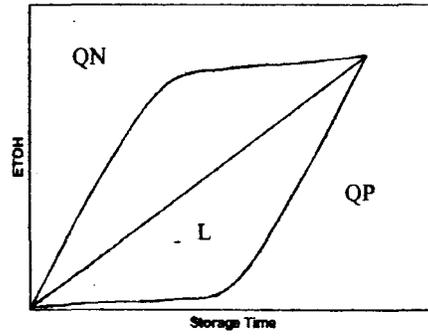
- respiration. In: Plant Physiology, biochemistry and Molecular Biology. Chapter 6. Dennis, D.T. and Turpin, D.H. (ed.). Longman, New York. U.S.A., pp. 90-91.
- Wang, Z. And Dilley, D.R., 1999. Control of superficial scald of apples by low-oxygen atmospheres. Hort. Sci., 34:1145-1151.
- Yahia, E.M., 1997. Modified/Controlled atmospheres for mango (*Mangifera indica* L.) in: Kader, A. (ed.) CA '97 Proceedings Vol. 3: Fruits other than Apples and Pears. (July 13-18). Postharvest Hort. Series No. 17, October. Department of Pomology, University of California, Davis. U.S.A., pp. 110-116.
- Yahia, E.M., 1998. Modified and controlled atmospheres for tropical fruits. Hort. Rev. 22:123-183.
- Yang, Y., Murayama, H., and Fukushima T., 1998. Activation of glyoxylate cycle enzymes in cucumber fruits exposed to CO<sub>2</sub>. Plant Cell Physiol., 39:533-539.
- Yáñez, L. L., Galicia, R.M., Alonso, R., Cabrera, D., Rocha, J. A., Torres, A., and Armella, M.A., 1999. In: (Retamales, J., Ferguson, A.R., Hewett, E. W., Defilippi, B.) Effect of CO<sub>2</sub> enriched atmospheres on ethanol accumulation in different ripeness stages of kiwifruit. Proceedings of the 4<sup>th</sup>. International Kiwifruit Symposium. Santiago de Chile. Acta Horticulturae No. 498. pp. 293-298.
- Zemanulkin, A.A., and Ivanov, B.F., 1978. Metabolism of Organic Acid Plants in the conditions of hypoxia In: Hook, D.D. and R.M.M. Crowford (eds.) Plant Life in Anaerobic Environments Ann Arbor Sci. Pubs. Ann Arbor Mich. U.S.A., pp. 203-209.

### Tables

#### I. Trends of ETOH accumulation in air and CO<sub>2</sub> for the studied commodities

	PRODUCT	STORAGE IN AIR	STORAGE IN CO <sub>2</sub>
1	Cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> , L.)	Linear	Linear
2	Strawberry ( <i>Fragaria X annanasa</i> , Duch.)	Linear	Linear
3	Potato ( <i>Solanum tuberosum</i> , L.)	Linear	Linear
4	Red Plums ( <i>Prunus domestica</i> L.)	Linear	Linear
5	Beets ( <i>Beta vulgaris</i> , L.)	Linear	Q. positive
6	Tomato ( <i>Lycopersicum esculentum</i> , L.)	Linear	Q. positive
7	Kiwi fruit ( <i>Actinidia deliciosa</i> , Planch.)	Linear	Q. positive
8	Peaches ( <i>Prunus persica</i> L.)	Linear	Q. positive
9	Leaf Lettuce ( <i>Letuca sativa</i> L.)	Linear	Q. positive
10	White Grapes ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	Linear	Q. negative
11	Orange ( <i>Citrus sinensis</i> )	Linear	Q. negative
12	Carrot ( <i>Daucus carota</i> , L.)	Q. positive	Q. positive
13	Banana ( <i>Musa paradisiaca</i> , L.)	Q. positive	Q. positive
14	Lime ( <i>Citrus limon</i> Burm F)	Q. positive	Q. negative
15	Prickly Pear ( <i>Opuntia ficus-indica</i> )	Q. negative	Q. positive
16	Apple ( <i>Malus pumila</i> Mill.)	Q. negative	Q. negative

Q. = Quadratic

Figures

1. General possible patterns for ETOH accumulation

## INTEGRAL HANDLING OF BANANA

LOURDES YAÑEZ, MIGUEL ARMENTA AND EFRAIN MERCADO  
*Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.*

ELHADI M. YAHIA  
*Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, 76010, Querétaro*

PORFIRIO GUTTIERREZ  
*Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit, México*

### 1. INTRODUCTION

Banana is one of the most important crops in the world. Over 10 million ha of bananas are grown, with a total production of more than 68 million metric tons, from which a little more than 10% is exported (Table 1). India is the principal world banana producer (16 million metric tons, 23% of world production), followed by Ecuador (7.5 million tons, 11% of world production), Brazil (5.7 million tons, 8.4% of world production), China (5.4 million tons., 7.9% of world production), Philippines (5.06 million tons., 7.4% of world production), Indonesia (3.6 million tons, 5.2% of world production), Costa Rica (2.2 million tons, 3.3% of world production), and Mexico (2.0 million tons, a 2.9% of world production) (FAO, 2001).

Bananas tolerate different weather ranges from the Temperate Rain Forest (12–18 °C, with 1000–1200 mm precipitation), up to the Tropical Dry Forest (more than 24 °C; 400–800 mm precipitation). They are grown in Africa, India, Central and South America under ideal temperature conditions (25–30 °C). Growth temperature should not be lower than 15 °C and the highest temperature should not exceed 35 °C (Robinson, 1996).

*Table 1.* Total production (1000 MT) of bananas in the world and in some selected countries (FAO, 2001).

Total world production	68,651.3
India	16,000.0
Ecuador	7,561.2
Brazil	5,744.2
China	5,393.0
Philippines	5,060.8
Indonesia	3,600.0
Costa Rica	2,270.0
México	1,976.7
Thailand	1,720.0
Burundi	1,548.9
Colombia	1,380.5
Viet Nam	1,125.5
Venezuela	1,050.0

Banana (*Musa* spp. group AAB) is a perennial giant herbaceous plant, with roots, rhizome stem or bulb type, and some adventitious roots. Roots are 5 to 8 mm in diameter and two or more meters high. Secondary roots are numerous, but they are weak and have low penetration strength (1.5 m deep). This is one of the reasons why banana plants cannot grow in stone or clay soils (Belalcazar, 1991). They are propagated by one or more pseudostems, sometimes of large size, each at flowering stage. Leaves are oval shaped, their apical end is conical, their colour is normally dark green at the upper part and light green in the lower part, they are arranged in a spiral fashion and they are base sheathed, long, big, and strong. They tear down transversally due to high winds. The terminal inflorescence emerges from the sheathed foliage, as a straight or bended spike, carrying flower clusters under wide and reddish bracts (Israelí and Lahav, 1987; Belalcazar, 1991). When a plant is totally developed, an acorn-shaped flower appears at the upper part, among the leaves. Flowers are arranged in clusters, 12 to 20 per nodule, in two row groups named 'hands'. They are unisexual; the upper clusters rachis acts as male flowers, the ones at the lower part act as female flowers and give rise to fruit formation. The calyx is tubular, and the corolla is represented by an opposite petal, whole or dentate; they generally have 6 stamens and one stamminoid, depending on the variety and growing conditions. They grow from the pseudostem base towards their apical end in a month, with a mean growing rate of 8 cm per day. The fruit is a big cylindrical berry, containing many ovules, but no seeds (Salunkhe and Desai, 1984). Its development is determined exclusively by pulp accumulation in the cavity formed by the inner pericarp walls. Banana fruits curve upwards (e.g. Gros Michel) in contrast to bunch growth. In most cultivars, fruits stick out in all directions, making their transport difficult (Salunkhe and Desai, 1984). Bananas are vegetatively propagated (Morton, 1987; Belalcazar, 1991). The total vegetative phase is accomplished in 5 to 6 months, reproductive phase lasts 12 to 15 months and productive phase may last up to 10 months, 4 of which for the development of fruit clusters filling (Belalcazar, 1991; Montero, 1998).

Bananas can be processed into a variety of products, such as dried or fried banana chips, dried banana powder, flakes, juice, puree, and jam. In Africa bananas are converted into beer with high vitamin content.

Water is one of the main components of bananas (Table 2). The energetic content per 100 gr of edible tissue is of 389 kJ and 92 kcal. Table 2 indicates its chemical composition (Belalcazar, 1991; Terranova, 1995; Senser and Scherz, 1999).

## 2. BANANA PLANTATION MANAGEMENT

### 2.1. Propagation

Banana propagation is achieved by means of bulbs that come from fructiferous branches. If it is the second time or more that propagation is made, it is important to prune buds and preserve just one, which produces a vigorous bulb. By doing this, soil is used in a homogeneous way and the selected bud makes good use of the bulb's nutritive reserves. It is always desirable to establish a homogeneous

Table 2. Chemical composition of bananas.

Water	61–70%	Vitamin B1	45 <sup>c</sup>
Protein	1.1%	Vitamin B2	55 <sup>c</sup>
Lipids	0.2%	Vitamin B6	370 <sup>c</sup>
Carbohydrates	27–36%	Biotine	6 <sup>c</sup>
Sucrose	10.4 <sup>a</sup>	Folic acid	20 <sup>c</sup>
Crude fiber	0.6%	Vitamin C	12 <sup>b</sup>
Minerals	1.0%	Malic acid	360 <sup>b</sup>
Calcium	5–8 <sup>b</sup>	Citric acid	12 <sup>b</sup>
Phosphorous	30 <sup>b</sup>	Sodium	1 <sup>b</sup>
Iron	0.50 <sup>b</sup>	Potassium	395 <sup>b</sup>
Thiamine	0.07 <sup>b</sup>	Magnesium	530 <sup>c</sup>
Riboflavin	0.03 <sup>b</sup>	Chloride	110 <sup>b</sup>
Niacin	0.50 <sup>b</sup>	Copper	130 <sup>c</sup>
Vitamin A	540 UI	Zinc	220 <sup>c</sup>
Carotenes	230 <sup>c</sup>	Manganese	530 <sup>c</sup>
Vitamin E	270 <sup>c</sup>	Iodine	3 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> g/100g, <sup>b</sup> mg/100g, <sup>c</sup> µg/100g.

plant distribution in all plantations. Each banana plant must have an amount of growing surface such that its leaves are sun-illuminated. Planting is commonly made in a rectangle or square due to the advantages it represents. The vegetative tip must be very superficial, hence the bulb must be sown no more than 60 cm deep in well-drained soil, or 40 cm deep in even soils. Bulbs should be homogeneous in size to avoid any competition from neighbouring bulbs (Champion, 1986; CCIA, 1996).

Banana fruit development exhibits a sigmoid curve. This means that its growing pattern has three phases. A logarithmic phase in which its size ( $V$ ) increases exponentially with time ( $t$ ); its growth rate ( $dV/dt$ ) is slow at the beginning; then the growth rate continuously increases. This phase is influenced by the constant activity of the apical meristem. Finally, the senescence phase is characterised by a decreasing growth rate as the plant reaches maturity and begins to senesce. In a newly established plantation, the vegetative cycle is closely related to soil properties, weather, and other factors. In recently sown fields, the vegetative cycle (from anthesis through harvest) can be from 16 to 18 months at temperature averaging 22 °C, while it may take 10 to 12 months in temperatures averaging 28 °C (Montero, 1998).

## 2.2. Irrigation

It is assumed that each plant at the time of harvest contains about 200 Kg of vegetative material, from which approximately 90% is water. Therefore, an adequate continuous water supply is important. A great part of fruit size and weight depend on the water supply. Therefore, irrigation and drainage are important for water equilibrium during crop development (Montero, 1998).

Irrigation techniques require knowledge of soil features. It is possible to reduce water usage and irrigation frequency. Care must be taken in attaining such periodicity in periods of irregular precipitation. Sprinkling is the most commonly used

technique in several countries. It is suggested that overnight irrigation be used to avoid high evaporation losses. Underground irrigation has been adopted in places where 'Gros Michel' plantation density is low; however, where densities are high, pseudostems represent obstacles that can cause irregular watering. Sprinkler system establishment is possible when plantations have adequate water supplies. Water flow rates determine the number of sprinklers that can work simultaneously. Soil hydrological characteristics will indicate irrigation time and frequency (Champion, 1986).

Superficial irrigation is convenient in permeable soils with a high capacity; in porous soils drainage losses can be very high. Regular water distribution can be a difficult task. This system is convenient when water resources are abundant and cheap as well as whenever there is good gravity water flow availability. Water freely spreads all over the surface. Changes are followed and settled either in the soil itself or in cement trenches following the land topography. In The Canary Islands, narrow terracing is advantageous in places with pronounced slopes. Wells are established along 10–20 m long terraces bordering 2–3 wide soil margins. Slight, regular slopes are empirically determined in such a way that water arrives at the strip at a regular pace. In Guinea, a circular bucket is sometimes used as an irrigation system for each banana plant (Champion, 1986).

Plant root development and cluster holding requires suitable drainage. A problem resulting from poor drainage is plant rot and wilting. However, plant response to water excess can be confused with nutritional deficiencies expressed in leaf discoloration such as chlorosis or yellowing and colour loss (Montero, 1998). When it is possible to eliminate water at the surface, this operation is called superficial drainage, and when it is made underground it is called sub-superficial drainage.

### **2.3. Fertilisation**

Nitrogen is the most important element in banana plantations. This element also affects flavour, and its deficiency is associated with off-flavours, i.e. when nitrogen supply is restricted (0.25 Kg nitrogen per plant) 'earthy' or 'musty' off-flavour develop in 'Valery' bananas, and when 5 Kg of nitrogen are provided per plant, flavour can be very good, even excellent (Palmer, 1980). It is preferable to design fertilisation plans based on foliar and soil analysis, along with other horticultural practices to insure excellent quality (Montero, 1998). Special attention must be paid to microflora, organic matter content, and other soil physical and chemical characteristics, in order to find out its fertility status as well as land and plant productivity potential, nutrient availability, their function, nutritional requirements, ways of nutrient application, and humus and organic material supply to the used soil (CCIA, 1996; Montero, 1998).

This operation consists of cutting all folded leaves, which are useless to the plant to avoid free cluster development (protective defoliation) and all those affected by yellow or black sigatoka disease (sanitary defoliation) (Laville, 1977; Montero, 1998). Defoliation must be performed weekly from the appearance of two to three hands in the stem to avoid leaf damage to the hands.

#### 2.4. Sanitary measures

Diseases, pests and weeds constitute natural risks the producer must face in any cultivated species. Their attacks not only cause a decrease in production but also affect fruit quality (Compañía Frutera de Sevilla, 1995). Diseases are more important causes of losses in bananas than pests. The most important diseases that damage bananas include:

1. Banana disease or banana wilt, which is caused by soil-borne fungus and usually results in the death of the entire plant. 'Cavendish' varieties are resistant to this disease.
2. Sigatoka disease or leaf spot is caused by an air-borne fungus that attacks the leaves and reduces the area available for photosynthesis.
3. Bacterial wilt or Moko disease is similar to Panama disease in external systems. Infected plants generally die, and if they survive the bunches will show premature ripening and rotting of the isolated fingers.
4. Bunchy top is a viral disease that results in vegetative stunting and abnormal fruit bunch development, often splitting the pseudostem before they emerge. The fruit of infected plants are commonly small and unsalable.

#### 2.5. Fumigation

In order to protect fruit against insect-transmitted fungal diseases, clusters are fumigated weekly after defoliation once two to three hands in the stem are apparent. Clusters should be wrapped in perforated polyethylene sacs after each fumigation. Thiabendazol (Mertect 340) is used as a fungicide applied at 200 ppm to 400 ppm depending on the season. Sprayed fungicide should be evenly applied on all surfaces of a cluster (Champion, 1986). Also, when fruits start to develop, Aldicarb (CA-MM, Gran. 15 formulation, 15.0–20.0 g/Ha), Carbaril (CC-MM, PH 80 formulation, 1.5 Kg/Ha) or Diazinón (FH-SE PH 25 formulation, 1.5–2.0 Kg/Ha) are applied to avoid the attack of thrips (*Frankliniella parvula* or *Thysanoptera*: thripidae). Thrips thrust their stylets into the small, developing fruits where they place their eggs, and, as a consequence, low quality fruits are produced. Insects feed from the fruit peel, which then exhibits small dark spots. Severe attacks make the peel rough and cracked, as well as causing a dry pulp. These insects are present all year round and so their population numbers fluctuate, but in some seasons generations overlap. Such insect population increments are found every 30 days (Lagunes and Rodríguez, 1988).

One of the most economically important causes of fruit losses is the presence of *Micosphaerella fijiensis* M, a fungus that attacks banana plant leaves, and decreases yield from a 50 to a 100% in Nayarit, Mexico. Control methods are very expensive, therefore the use of tolerant genotypes, such as FHIA-01 and FHIA-2, has been successfully evaluated. Production costs might be reduced and important increases in yield could be obtained.

De Costa and Subasinghe (1998) have studied the possibility of using bacterial isolates associated with the fruit skin of banana as potential biological control agent:

of postharvest fruit diseases. They reported that the bacterial antagonists inhibited growth of *Fusarium* sppm, *C. musae*, *Botryodiplodia* sp., and *Ceratocystis paradoxa*, and the pathogens of crown rot disease, by 30–42% under *in vitro* conditions.

## 2.6. Pruning

This operation is very important for adequate selection of the type of buds to guarantee production continuity. The 1–3 most vigorous buds are chosen for each productive unit, taking care to maintain good proportionality in light and distance between plants to improve luminosity effects on photosynthetic activity. Therefore, good illumination is needed to optimise cluster development as well as the other vegetative formed. Pruning is usually made by means of a sharp, disinfected knife that allows removal of non-convenient buds (Montero, 1998).

## 2.7. Deflowering or ‘deacorning’

In some Latin American countries, male banana flowers are called ‘Acorns’. Once these flowers have accomplished their reproductive functions, they stay on the plant taking nutrient resources away from the rest of the plant, especially from female flowers, which hold banana fruits. In order to avoid this type of competition for nutrients, male flowers must be removed, preferably by hand. This task also decreases the incidence of ‘moko’ disease, caused by *Pseudomona solanacearum* bacteria, transmitted by insects, which could live on diseased male plants. This operation causes an increase in cluster weight and minimises falling plants caused by cluster excess weight (Montero, 1998). This operation takes place between 18 to 23 days after inflorescence, depending on seasonal conditions or when the false hand exhibits its fingers in a horizontal fashion or when there are two internodes between the false hand and the ‘acorn’. Then the shoot can be easily grasped, and the acorn is broken without damaging the fruit (Champion, 1986; Anonymous, 1980).

## 2.8. Wrapping

Early on during the development of the fruit, bunches should be covered with perforated polyethylene bags. The top of the bag should be secured to the stalk. These bags are important to prevent blemishes and scars in the fruit caused by leaves. In addition, a pesticide can be placed in the bag to reduce insect damage. The age of the fruit is usually recorded by using ribbons of different colours. Table 3 shows the dimensions of polyethylene bags commonly used for wrapping banana clusters.

A stair should be placed next to the plant pseudostem at a suitable height, so that wrapping operation can be properly made. The sac should be inflated in order to be able to introduce the cluster into it. The sac’s upper part should also be inflated at the tying site to assure that the sac under the tie is free. The sac should not be tangled up around the stem, and it should be tied at 40 cm over the first stem hand insertion point. Coloured plastic ribbons are suggested to tie the sac to the stem since they may also be used to identify the cluster’s harvest period. It is not

*Table 3.* Standard measurements for polyethylene bag covers, cm.

Thickness	0.05
Perforations	1.25
Distance between perforations	7.62
Width (plane)	81.28
Length (according to the cluster's number of hands and size)	116.84–182.88

recommended to use the plant pseudostem fibres or any other plant material since these may decay, causing sac slippage over the fruit and thus un-protecting it. It is also suggested that newspaper sheets be used along with the sac to cover the cluster in order to shade it at the points where sunlight is more intense, thus reducing sun-burned fruit losses.

### **2.9. Dehanding**

This procedure involves removal of one or several hands during fruit protection operations. This decreases cluster weight, but it is compensated by more even size and quality of fruit during most of the production season. It can also decrease harvest time per production unit, as well as a decrease in maturation days. Dehanding is made as soon as the cluster is wrapped, by first removing the false hand and leaving the deformed finger to prevent decay advance which generally starts at the end of the stem. The two apical hands (the lower ones) are removed by a slight spinning movement, making this a clean cut, and avoiding decay at the cut site. If the cluster does not show the deformed finger at the false hand, the first incomplete hand is removed and then the two next real female hands are dehanding.

### **2.10. Holding**

Banana plants are sensitive to flattening due to cluster weight and wind damage. There are two holding systems that can be used to avoid damage after dehanding. One technique involves rubber bands and bamboo canes. Rubber band support is achieved with the aid of a ladder carefully placed on the plant pseudostem. Two rubber bands are stretched from the upper part between the pseudostem leaves and the cluster to balance the cluster weight. The rubber bands are tied between the leaf petioles or anchored by means of a little piece of wood. They are stretched until they reach two pseudostems opposite to the cluster. They are then tied approximately at 40 cm from the ground in each pseudostem. Another technique to support clusters is by means of bamboo canes by placing two canes in a scissors-like fashion, leaning on the plant pseudostem opposite to the plant's cluster. It is advisable to replace rubber bands and bamboo canes periodically to minimise possible flattening (Anonymous, 1980).

### 3. FRUIT RIPENING

In order to identify good strategies for banana postharvest handling and storage, it is necessary to have a clear understanding of the physiology and biochemistry of fruit ripening. During the ripening process, a fruit goes through a series of marked changes in colour, texture and flavour, which indicate that diverse changes in composition are taking place (Abdullah and Pantastico, 1990).

Respiration is a fundamental metabolic process in harvested produce. Complex chemical compounds in the cell, such as sugars, organic acids and lipids, undergo oxidative degradation to more simple molecules, such as carbon dioxide and water, with the consequent energy release and other molecules that may be used for cellular synthetic reactions. Respiration can be divided into three phases:

- (1) Hydrolysis of polysaccharides into simple sugars.
- (2) Sugars oxidation into pyruvate through glycolysis.
- (3) Pyruvate and other organic acids undergo aerobic transformation into CO<sub>2</sub>, water and energy through the tricarboxylic acids pathway and the oxidative phosphorylation process.

Fruits are divided into two categories: climacteric and non-climacteric, according to their respiratory pattern after harvest. Banana is a climacteric fruit that can be harvested mature green and ripened later. Fruit respiration rate is about 10–30 ml CO<sub>2</sub>/kg. hr at 13 °C, and 20–70 ml CO<sub>2</sub>/kg.hr at 20 °C. Banana respiratory activity decreases once fruit is harvested and it continues like that for a short preclimacteric period. Extending this period is a commercial objective because fruits are easier to handle and they can be kept longer in storage. Approximately 12 days after harvest, and often during storage, respiratory activity increased from 20–40 mg CO<sub>2</sub>/Kg/hr to about 120–125 mg CO<sub>2</sub>/Kg/hr as the fruit ripened and reached the climacteric peak (Palmer, 1971). In most cultivars, this is when bananas attain their characteristic bright yellow colour. Then respiration decreases to approximately 100–125 mg CO<sub>2</sub>/Kg/hr near senescence (postclimacteric period) in suitable storage conditions (18–20 °C, with high, over 80% humidity). Senescence is defined as the time when biomolecules synthesis decreases and catabolic activity increases, characterised by brown spots appearance on the skin (Palmer, 1971; Salunkhe and Desai, 1984; Abdullah and Pantastico, 1990). Such a respiration pattern is typical of climacteric fruits (Salunkhe and Desai, 1984; Burdon, 1997) and the rate increases with increasing temperature. The respiratory quotient (RQ) is the ratio of the number of molecules of carbon dioxide given off to the number of molecules of oxygen absorbed, and is used as a general indication of which particular substrate is being used as the major source of respiratory energy. In whole bananas there is a distinct lowering of the RQ during the climacteric, followed by a return to about one in the postclimacteric period. The main respiratory substrate during the climacteric might be fatty acids, and perhaps glucose at a postclimacteric stage. It is thought that an alternate cyanide-resistant respiration indirectly participates in the climacteric respiration increases (Theologis and Laties, 1978).

Another feature of climacteric fruits is that they ripen in response to ethylene. Ethylene is a simple gas that plays a very important role in fruit growth, develop-

ment, and ripening at concentrations as low as 0.01 ppm. Ethylene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) is a hydrocarbon constituted by two carbon atoms with a double bond. It is colourless, flammable, similar to ether, with a sweet aroma, and its explosion limits are from 2.75–28.6% in air. Due to the double bond, ethylene absorbs UV light at 161, 166 and 175 nm. Its diffusion coefficient in air is about 10,000 fold higher than in water. Ethylene has a molecular weight of 28.05, freezes at –181 °C, boils at –103.7 °C, fuses at –169 °C, its relative density in air is 0.978, and its specific volume is 861.5 ml/g at 21 °C (Abeles et al., 1992). Its double bond makes it sensitive to high energy radiation such as  $\gamma$  rays, which degrades it, resulting in acetylene, butane, ethane, hydrogen, and methane formation (Abeles et al., 1992). Theologis (1993) described ethylene as a plant hormone which co-ordinates fruit ripening due to the series of metabolic changes which have been reported to coincide with high levels of ethylene release when fruits ripen. Ethylene does not require active transport from its production site to its active site, so it is simply transported by diffusion. Ethylene concentrations are regulated through its own synthesis and diffusion rates to the outside causing noticeable physiological effects at low concentrations (Abeles et al., 1992). Inner ethylene distributions are not uniform. Within plant organs, tissues produce ethylene at different rates, causing different diffusion resistance. Diffusion routes depend on tissue structure. It has been suggested that ethylene transport occurs through the xylem or the phloem. Ethylene diffusion gradients are determined by the surface/volume ratio, diffusion resistance and ethylene production rates (Abeles et al., 1992). Ethylene production is almost undetectable in the preclimacteric respiration phase (Domínguez and Vendrell, 1993). Increases in ethylene occur slightly before or at the same time as the respiratory climacteric, as shown by a peak of about 0.05–4  $\mu$ l/g FW/hr attained in about 24 hr, one day before the respiratory climacteric peak (Domínguez and Vendrell, 1993; Robinson, 1996). Decreases of this hormone reach fairly constant levels, which are nevertheless much higher than during the preclimacteric stage. Although ethylene is produced by the fruit, ripening can also be stimulated by exogenous ethylene application, the so-called ethylene autocatalytic synthesis (Domínguez and Vendrell, 1993). Thus, exogenous ethylene applied at a concentration as low as 0.1–1  $\mu$ l/L for just one day is normally sufficient to hasten full ripening of this and other climacteric fruits (Abeles et al., 1992). Ethylene production in banana is about 0.1–2.0  $\mu$ l/kg.hr at 13 °C and 0.3–10  $\mu$ l/kg.hr at 20 °C.

Under normal ripening conditions, the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACCO), also known as ethylene-forming enzyme (EFE) forms ethylene from its precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). Recent findings indicate that ethylene binds to an ethylene receptor molecule (ETR-1), which is located in cellular membranes, resulting in a second messenger release. This second messenger migrates to the cell nucleus and causes an increase in transcriptional activity of genes influencing fruit ripening (Gutiérrez et al., 2001).

Both pulp and peel produce ethylene; however, banana ripening is co-ordinated primarily by pulp ethylene production essential for ethylene production in the peel as well as for de-greening of the peel. Once the peak in ethylene biosynthesis has been reached in the pulp then ACCO activity increases in the peel and even exceeds that in the pulp during the later stages of ripening (Clendennen et al., 1997). There

are two different mechanisms in which membranes may affect ethylene biosynthesis regulation. One is the direct effect on enzymes associated to the membrane. The second one involves cellular membranes as translators for *de novo* enzyme synthesis that affect ethylene biosynthesis.

Banana fruit ripening is characterised by several biochemical and physiological changes due to 'organisation resistance' breakdown as well as a marked increase of membrane permeability, with accompanying cellular decompartmentation and metabolic deregulation (Theologis and Laties, 1978; Palmer, 1971). This leads to fruit softening, changes in peel colour, a massive breakdown of starch and its conversion into sugars, as well as changes in acidity, among others (Kanellis *et al.*, 1989).

Most fruits tend to soften during ripening. This is the main attribute determining a produce shelf life. Fruit softening may increase due to three reasons: turgor loss, starch degradation, or fruit cell wall breakdown. Turgor loss is a non-physiological process associated with postharvest water loss.

Banana cell walls are made up of pectin, cellulose and hemicellulosic substances (Kanellis *et al.*, 1989). During ripening, protopectin (insoluble pectin), a large polymer crossed-linked to other polymer chains with calcium bridges and bound to other sugars and derivatives forming a very large polymer, decreases from 0.5% to 0.2% fresh weight with a corresponding rise in soluble pectin. This is due to pectin methyl esterase and polygalacturonase enzymes activity in three molecular forms (Palmer, 1971; Abdullah and Pantastico, 1990; Robinson, 1996). Pectin is gradually broken down to lower molecular weight fractions, which are more soluble in water (Abdullah and Pantastico, 1990; Seymour, 1993; Koteçha and Desai, 1996). Cellulose (2–3%) decreases only slightly during ripening due to cellulase enzyme activity (Palmer, 1971; Kanellis *et al.*, 1989). Hemicelluloses of the fresh green banana pulp appear to constitute the largest fraction of cell wall materials (8–10%). They decrease to about 1% in ripe fruits due to hemicellulase enzyme activity (Kanellis *et al.*, 1989). They are thought to be labile reserve carbohydrates and potential source of sugars, acids and other respiratory substances during ripening (Palmer, 1971). Hence, fruit firmness decreases as a consequence of cell walls and weakening cohesive forces, which bind cells together. In the initial ripening stages, fruit texture becomes more palatable, but in later senescence stages fruit structure disintegrates and texture can soften extensively.

Changes in colour are often the main criterion used by consumers to determine maturity stages in fruits and to decide whether they must be eaten the same day they are acquired or later. Colour stages in ripening 'Cavendish' bananas are described in Table 4 (Salunkhe and Desai, 1984).

Green colour in banana (as it is in other horticultural crops) is due to the presence of chlorophyll, a magnesium-organic complex. Degradation of chlorophyll by chlorophyllase activity results in fruit colour changes (Palmer, 1971). Chlorophyllase activity in banana peel increases sharply at the onset of the climacteric to a peak which coincides with the climacteric peak, and then falls to near zero in the post-climacteric period (Palmer, 1971). The principal agents responsible for this degradation are pH changes (mainly due to a leakage of organic acids from the cells vacuoles), oxidative systems and chlorophyllases. Chlorophyll disappearance

Organic acids levels commonly decline during ripening as they are used as a substrate for respiration or converted into sugars. However, bananas are an exception because the highest acid levels are attained when the fruit is fully ripe (pH from about  $5.4 \pm 0.4$  in pre-climacteric to about  $4.5 \pm 0.3$  in post-climacteric pulp). Titratable acidity of plantains is 8 meq/100 g FW and it is about twice that of sweet bananas, although acidity is not high at any stage of development compared with other produce (Palmer, 1971). In 'Gros Michel' banana pulp, malic, citric and oxalic acids were found to be major constituents; glutamic, aspartic, quinic, and glyceric acids were minor constituents (0.005–0.1 meq/100 g FW) (Palmer, 1971). It was also found that total acidity of 'Gros Michel' banana pulp was 50% oxalic acid, 35% malic acid and 10% 'citric peak' acidity (citric acid plus certain phosphates). During ripening, both malic and 'citric peak' acidity increased three-to-four-fold and oxalic acid dropped to 60% of its original value. The net result was a doubling in organic acidity during the climacteric, with malic acid becoming the major acid (65% of total acidity). Another important feature is that oxalic acid generally occurs in plants as water-insoluble and metabolically inert calcium oxalate. However, in bananas it is completely water-soluble and its decrease in ripe bananas suggests that ripening bananas are capable of metabolising it, although its products have not been identified.  $\alpha$ -Oxoglutaric and pyruvic acids levels during banana ripening differ among varieties during banana ripening (Palmer, 1971).

Little has been reported concerning ascorbic acid, but a slight decrease in this acid in banana pulp was observed right after the climacteric, and concentrations fell gradually to 10–12 mg/100g FW at full ripeness and then held constant until the fruit began to spoil (Palmer, 1971).

Ripe banana fruits contain at least 200 individual volatile components (Palmer, 1971), including esters, alcohols, ketones, aldehydes and phenol esters (70%). Acetates and butyrates predominate within the latter fraction. 'Banana like' flavour is due to the presence of amyl esters, and that distinctive 'fruity' like flavour is due mainly to butyl esters (Seymour, 1993). Volatile production increases during banana ripening until the onset of peel browning, where production reaches a plateau or decreases. Metabolism of fatty acids, which are converted to esters by banana tissues, is one of the routes of production of volatiles, as well as from some amino acids such as leucine and valine.

One of the main problems with banana peel and pulp is the presence of phenolic compounds such as 3,4-dihydroxyphenylethylamine and 3,4-dihydroxyphenylalanine, which, when oxidized by the enzyme polyphenoloxidase (EC 1.10.3.1), are responsible for the rapid browning of banana tissues. Banana cultivars which contain high levels of ascorbic acid, had lower contents of polyphenoloxidase activity and therefore exhibited low browning rates (Seymour, 1993). Studies have also shown that these enzymes specifically oxidise o-diphenol compounds.

Peroxidases are also present in ripening banana fruits. They catalyse in the presence of  $H_2O_2$  the oxidation of substrates such as phenols, aromatic secondary and tertiary amines, glucosides, ascorbic acid and some heterocyclic compounds such as indoles. An increase in cell wall-associated peroxidase activity has been found to occur with the initiation of the climacteric rise in respiration (Seymour, 1993).

Tannins have been found in banana fruit tissue, particularly in the peel. They are water-soluble phenolics with molecular weights of 500 to 3000. They precipitate alkaloids and proteins. According to Seymour (1993), tannins in banana fruits seem to be confined mainly to the latex vessels of the pulp and peel. Tannins interact with salivary proteins and glycoproteins, hence causing astringent fruit taste. Such astringency gradually disappears due to tannins depolymerization as fruit ripens.

Fatty acids in banana do not change substantially during ripening. They comprise about 1% dry weight of the pulp and 6.5% of the dry weight of the peel. The principal fatty acids are palmitic (16:0), oleic (18:1), linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acid, with a reported tendency towards a loss of unsaturated fatty acids in both pulp and peel during ripening (Seymour, 1993). Although changes have not been found to be considerable, some alterations have been noted, mainly in the phospholipid fraction with an increase in the proportion of linolenic acid and a decrease in the proportion of linoleic acid. Increases in the unsaturation of the phospholipid fraction may result in increased fluidity in cellular membranes during ripening which may be the reason why sensitivity to chilling injury changes in banana as ripening progresses, being less sensitive as ripening proceeds (Colinas, 1992; Seymour, 1993).

#### 4. MATURITY AND HARVESTING INDICES

One of the important factors influencing the commercial value of bananas is its stage of maturity at harvest and freshness through the marketing period. Consideration of shipping distance and whether fruits are consumed at different stages of maturity is required.

Bananas are commonly harvested year round; however, there is a high and a low production season, depending on the region (Anonymous, 1980). The adequate maturity index for banana is the degree of fullness of the fingers, which is indicated by the disappearance of angularity in a cross section. Normally, if weather conditions are adequate, harvest can be made at 80 to 104 days after anthesis (Champion, 1986; Anonymous, 1980). However, it is common to consider the time at which the fruit attains the optimum width, and how far will be its marketing destiny (Anonymous, 1980). Therefore, in order to determine optimum harvest date, one has to take into account fruit development. The most appropriate harvest time is when fruits do not increase in fresh weight (Montero, 1998). Fruit are harvested at the 'thin' or 'full' stages, which can be broken down to 'three quarters, light or thin', 'light full three-quarters', 'full three-quarters', 'full' (Champion, 1986). These terms refer to a transverse fruit cut which faces, limited by the edges, at the beginning, plane or slightly concave, and then they turn to convex (Figure 1) (Champion, 1986)

In practice, this constitutes a problem in 'giant' bananas, with bunches located several meters from the ground because the harvester estimates fruit dimension visually. In order to make this operation easier, diverse methodologies are used. In Central America, 'Gros Michel' banana fruit diameter is measured by calibre and by means of devices including boards with calibrated holes that indicate the

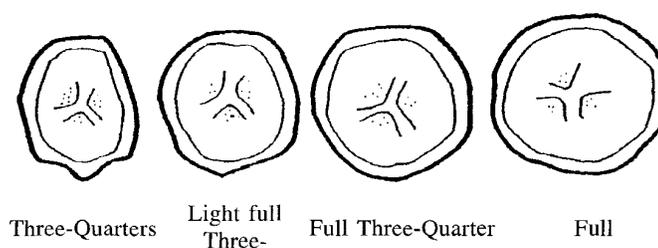


Figure 1. The changes in size and shape of banana fruit sections due to advanced maturity.

limits in which the optimum fruit width should stand according to international standards (Champion, 1986). Such measurements should be made in one finger, which must be precisely located at the middle of the outer bunch second hand. Minimal dimensions must be 3.3 to 3.9 cm diameter and 20.5 cm long (Anonymous, 1980).

Another concept used to determine standard fruit dimensions more precisely is the 'fullness index', which is the quotient between the inner faces weight and length measured as a longitudinal plane. If it is considered that a banana's density varies slightly (0.96 approximately for a mature fruit), this index represents a mean surface and it varies as the fruit widens. A 'fullness index' scale has to be established for every variety. These measurements are obtained by means of a curvimeter designed by Deullin et al. (1960) (Champion, 1986). The formula for this is:

$$\frac{W \text{ (g)}}{L \text{ (cm)}}$$

Where:  $W$  = Weight (in grams), and  $L$  = Length (in cm).

According to this formula, 'Nain' bananas' correct 'harvest index' is within the range of 7.9–8.3 in order to withstand an approximately 10-day transport. Their weights varied between 133 and 140 g and their lengths varied between 16.3 and 17.7 cm. However, not every cultivar has a curvimeter, so this technique may not be generally practical.

It is evident that the producer's interest is in obtaining rounded fruits in order to obtain a potential 10 to 25% weight gain. However, problems that may risk a producer's profits include:

1. Extended bunch development in the plant, which could lead to early ripening after the cut.
2. If the harvester chooses to observe pulp development, which sometimes is much faster than rind development, colour, which should remain white or slightly creamy, and its texture. A penetrometer calibrated for bananas should be used for measuring pulp resistance (once fibres and bundles are removed) with a 4 mm metallic probe capable of measuring the equivalent of 25 g pressure. Thus, a reading of 45 a 55 means that fruits are still far from the ripening stage and they are suitable for long distance transportation, and a reading of 35 to 40 means

that the pulp has started softening and the bundles will have to be handled and transported with extreme care. A reading of 30 means that the fruit has to be locally consumed, in view that it has started its ripening process.

3. If one lets banana fruit widen and get rounded, it is more likely to split apart and its pulp turns mealy and bitter (Champion, 1986). On the other hand, if it is harvested short before maturity stage, when its edges are really marked, then ripening takes place quickly, and there will not be enough time for its transportation in good conditions to distant markets.

## 5. HARVESTING

When banana cultivation is intensive, bunches ready to be harvested are usually marked with a coloured ribbon just a few days before this operation. Extreme care must be taken during banana harvest and transportation to the packing station because any bruise causes skin darkening, in addition of initiating an infection point.

In dwarf bananas, bunches may be taken at the same moment when rachis is cut, far above the first hand (Champion, 1986). In the case of giant banana species, harvest usually requires two persons. One makes a cut with a big knife at approximately 1.5–2 m above ground level at the middle part of the bunches' pseudostem. Another person is located at the back of the person cutting the stem, waiting for the cut and catching the bunch. The person cutting the stem gently forces the bunch below the hand base to separate it from the plant (Laville, 1977). The bunches must be placed on a padded tray and cut through the bunch stalk (Laville, 1977). Heavy bunches may break or split apart if the operator is not careful; sometimes a rachis is tied to the pseudostem (under the bunch) to avoid these problems; thus, when a bunch falls, it stays parallel to the pseudostem. If dehanding is made in the field, stem must be cut and bunch must be gently brought down, then dehanding may start from the bottom hand (Laville, 1977).

Once bunches have been separated from the plant, care has to be taken to avoid

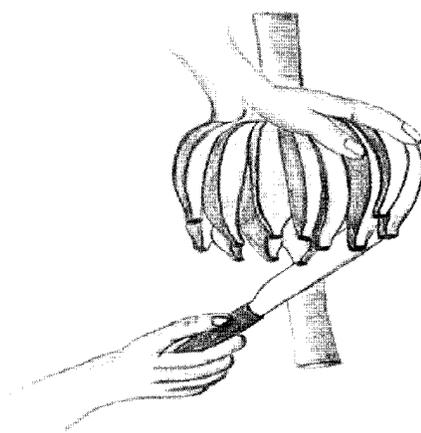
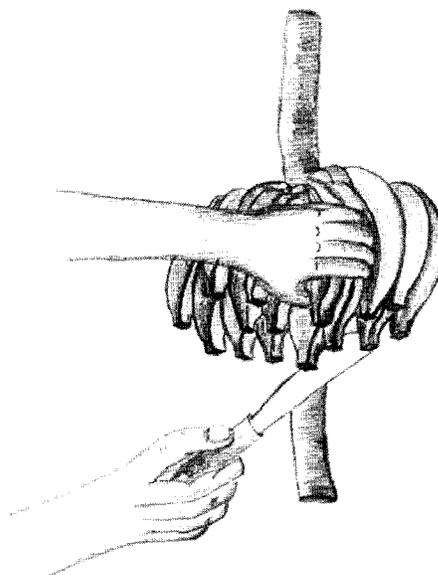


Figure 2. Banana cluster cut at the base of the hand, supported by the fingers.



*Figure 3.* Banana cluster cut at the base of the hand, taking it by the stem.

bruises to the fruit rind due to its contact with rough surfaces. Such bruises can cause fungal diseases, although 'Gros Michel' bananas are more resistant. Banana peduncles are extremely sensitive to stress as compared to the outer apical areas. Therefore, bunches should be placed carefully over soft surfaces or mattresses (spring or rubber mattresses) and always placed in the shade (Champion, 1986). Also polyethylene sleeves may be placed between two adjacent hands. Other materials that can be used include foam rubber, crumbled banana fibre pillows, straw between paper sheets pillows, etc.

In some places such as the Barlovento Islands, the bunch load in the field is standardised. The bunch is wrapped in polyethylene sleeves and placed on a wooden padded tray. Such trays substitute harvest containers and should preferentially be concave, so that the bunch can be perfectly placed avoiding any movement or rolling. Bunches are gathered in a given shaded surface to avoid sun burning which may affect quality (Anonymous, 1980).

Bunches have to be cleaned and checked before leaving the plantation. These are cleaned by removing floral remains, which can cause sap leakage and staining of the fruit. Aborted fruits that are frequently found in the last hand, as well as the ones with wet and dry apical rots, are also removed. Bunches are then dipped in an alkaline solution or sometimes calcium sulphate (as a coagulant) for 15 minutes (Montero, 1998). Alum (aluminium sulphate solution) is used as an antioxidant and to prevent subsequent latex exudate. The solution should be mixed adequately immediately before using (Montero, 1998). Sodium hypochloride (75 to 125 ppm) can also be used to prevent latex leakage as well as to kill fungal spores (Laville, 1977). Emulgator NP7 can be used for thorough fruit cleaning (Montero, 1998). A diothene pad is used to protect the cut crown (Laville, 1977). Bananas can be

immersed in a second water tank for additional 10 or 15 minutes at the packing station.

## **6. TRANSPORTATION FROM THE ORCHARD TO THE PACKING STATION**

Bananas are transported to the packinghouse as bunches. It is very important to reduce physical injury to the fruit during harvesting and transport. In small operations, bunches should be transported in one single layer, and with adequate material that can serve as a cushion. In bigger operations, bunches are transported with the use of different systems of cableways, commonly operated by tractors. The bunches are attached to the cable by its base, and should be separated by spacer bars to prevent their contact.

Fruit transportation from the plantation to the packinghouse should be made the same day of the harvest. Long stops, which expose fruits to the sun and heat, should be avoided. Mid-day transport should also be avoided or, if not possible, protective material should be placed over the fruit (Anonymous, 1980).

Light bunches are transported by carriers who place them on their head or on their back, in the latter it could be two or more clusters at a time. This operation is commonly done in coffee regions with banana plantations (Anonymous, 1980; Montero, 1998). If bunches are going to be dehanded at the plantation this operation is done with the aid of a curved knife. Two parallel cuts are made at the pseudostem and under the stem curvature so it will go down by its own weight at a determined height so the cutter will be able to dehand the cluster. Separated hands are placed in metal trays 100 cm length  $\times$  45 cm in width, covered completely with rubber and banana leaf pads to cushion and protect the fruit against damage during transportation. Once trays are filled with fruits, they are placed on platforms in carts to avoid falling during transportation (Laville, 1977; Anonymous, 1980).

Air cable is ideal for transportation but its installation is not easy. It is used in flat or gently, not pronounced sloped lands and installed at the plantation borders. If slopes are very gentle just a few clusters can be handled downhill. Nevertheless, this system simplifies fruit handling, minimises mishandling, and saves harvest time. Plant stems are protected by placing a piece of polyethylene film on the cluster's higher parts to avoid latex leaking over onto the first cluster hands. The high cost associated with this system is a disadvantage which must be considered, however it is cost-effective in big plantations (more than 200 ha.), especially those intended for export (Montero, 1998). Cables are built of galvanised iron poles in an inverted U fashion with a 12-meter separation between poles. The steel cable is joined to poles by means of hangers and rods. In this way bunches are transported to the packinghouse by means of rodines, which run over the cable way. Bunches are separated by spacer bars to prevent contact among banana bunches. Hauling can be manual or mechanical, a small tractor pulls trains of 75 or 150 bunches of 30 to 60 Kg along the cableway to the packing house. This method does not require a roadway or bridges to cross drainage ditches. Transportation speed should be limited to 8 Km/hr.

Rigorous supervision must be made to monitor this operation because it will generate wastage and fruit damage if done poorly. Decisions about adopting cable systems must be based on the advantages and disadvantages of this system to the producer (Montero, 1998).

Another transportation system involves a hauling train, which consists of two or three platforms or carts. These carts should be completely covered with small cushions made of paper and nylon to avoid bruising. Dry banana leaves should be placed on all of these layers to help minimise any damage during transportation from the orchard to the packinghouse. During this operation, a carrier assistant is necessary, to move the bunch by taking the end from the carrier's back and moving the bunch onto the cart in order to avoid any breakage. Bunches should be placed with the cut end towards the outer part of the cart and rubber or protective materials should be placed between them to avoid bruising. It is important that roads be well maintained, cart cushioning should be adequate, transport speeds should not be more than 10–15 Km/hr, and that cart cushioning surfaces should be kept clean (Anonymous, 1980; Montero, 1998).

Bunches are sometimes separated by means of coverings or provisional packages like banana leaves or foliar sheaths as practiced in Ecuador (Champion, 1986), although this may cause sanitary problems. Piling up of punches must be avoided.

## 7. CONDITIONING FOR MARKETING

High fruit quality is essential for successful marketing because it helps increase market prices and to satisfy consumer demand. Quality starts from the field. Once at the packinghouse, special fruit treatment is essential to preserve field quality, enhance fruit appearance, and make them more competitive at the market (Montero, 1998). The packinghouse must be covered, and exposure to the sun heat must be blocked to prevent fruit damage and to enhance the workers' comfort (Montero, 1998).

The packinghouse floor must be dry to increase efficiency. All fruit shipments must be processed as the following:

- Every bunch must have its respective ribbon, otherwise the packinghouse chief or producer must be alerted to correct this mistake.
- Received amount of banana hands should be recorded, bunch weight, percentage of rejected or lost bunches must be made. It is important to know each lot condition and its yield according to weight and quality.
- Fruit defects must be recorded with the objective of improving bunch quality. When fruits arrive mishandled due to a poor harvest or transport, an alert must be sent immediately to the field ranger to correct the anomaly.
- Bunch classification should be done as follows:
- Full bunch: Fingers that have lost their edges (rounded).
- Mature bunch: Bunch with one or more mature fingers, without mechanical damage.

- Poor bunch: A bunch with retarded normal development, short fingers that present a tip protuberance (more pronounced and distinct from that of a normal bunch).
- Sick bunch: A bunch with damage and decay higher than 50%, must be rejected, but if the damage is lower, good parts can still be used according to the quality concepts.
- Good or clean bunch: The bunch not exhibit damage or decay.

A packinghouse must fulfil certain conditions for correct operation:

- Avoid wastage accumulation (rejected fruits and trash) in the packinghouse.
- Tanks and floors must be clean and washed as often as the cutting program requires it. As a general rule, a complete packinghouse cleaning must be made at least once a week.
- Water and functional tanks must be available for washing and all the other farm processes.
- Shipping and any kind of transportation must not be made without a clear knowledge of market specifications concerning amount, quality and fruit volume are being fulfilled at the packinghouse.

Upon arrival to the packinghouse, the fruit should be inspected for finger fullness and length, bruises, blemishes, scars, insect attacks, and decay. Only fruits that meet the quality grades should be accepted and packed. Inferior quality fruit can be sent for processing.

Bananas are then deheaded using a sharp curved knife, and immediately placed in a water tank. Water is needed to coagulate the exuded latex and thus reduce the staining. In addition, water serves to eliminate dust and dirt, and partially cools the fruit. Fruit is commonly placed in a second water tank for 10 to 15 minutes to further eliminate the latex. In addition, an antioxidant and/or a fungicide can be added to the second water tank to reduce oxidation (darkening) of the cut surfaces, and the development of decay organisms. Thiabendazole and imazalil are commonly used fungicides for banana. Sodium hypochlorite at a concentration of 75 to 125 ppm is also commonly added to the water to reduce decay organisms. Water should be changed regularly to avoid the increase of inoculum. The chlorine concentration in the water should also be monitored regularly using indicator papers. Fungicides can also be added separately after washing either as spray or dip.

The main operations at the packinghouse include:

### **7.1. Selection**

This process involves selecting fruit, especially with respect to plant sanitation, quality and appearance. At the packing place, there must be a person in charge of receiving fruits when they arrive from the orchard, commonly known as the fruit inspector. This person must supervise and record the bunch quality and harvested variety (Montero, 1998). Fruit defects are also taken in order to discard misshapen fruits from the market, all according to specific regulations.

## **7.2. Classification**

This operation consists of fruit hand removal, cleaning and weighing. Fruit classification is made according to size and market demands; thus, they may be exhibited as fingers, clusters or complete hands, according to fruit weight, depending on the type of market, national or international, and on the requested specifications (Montero, 1998).

## **7.3. Dehanding**

Dehanding can be made with a very clean, sharp knife or a slicer. The dehanding person must wear gloves on both hands. Cuts must be made even, very close to the bunch's rachis to support the hand with firmness and avoid loosening of fingers. Care must be taken to avoid damaging fruits with the knife or slicer. The dehandler must take the fruit by its crown with a minimum of three fingers to avoid mishandling, peduncle bruises, collar bending or the dehandler must cut them with the slicer (Montero, 1998).

## **7.4. Washing**

After dehanding, fruits must be placed in a washing tank and caution must be taken to avoid throwing of hands over each others, tank edges rubbing, and protection from mishandling scars. All of these defects become noticeable once fruits have been dried. Water must be kept flowing to avoid latex or spot accumulation. Water is mixed with alum (100 g/10 L) to help remove latex and control microorganisms, especially if this operation has not been made in the field. Latex is removed because if it dries over fruit surface it can darken its appearance, and hence negatively influences its marketing value (Montero, 1998).

## **7.5. Cluster preparation**

This process is made by 'selectors, cutters or sanitary workers', using very clean and sharp knives. Each hand must be checked, and fruit with defects such as cigarette tip, off-shaped, sunburn, striped, premature maturation, fungal problems, trips excess, malformations must be separated. The fruit is then cut in three to five finger clusters or separated into individual fingers, depending on the type of market, but in both cases a knife must be used. This operation should be done adequately to avoid additional mechanical damage or accidents. In the case of dirty fruits (with fumigation residues, latex, sooty mould and other substances), a sponge and a washing solution should be used.

Whenever fruits are prepared by clusters, the crown must be arranged by means of correct cuts. If fruits are to be offered by fingers, the peduncle must be slightly roughed down to avoid a rough surface exposure, which is prone to fungal attack. When fruits are prepared by hands, defective fingers must be removed and the crown must be arranged, thus making the hand healthier (Montero, 1998).

Fruit fingers must be removed with a slicer or a knife, but never with the

operator's hands. When fruits are requested as sorted, i.e., by clusters, by fingers, as well as by sizes, divisions must be placed in the tank. The sanitary operator must take this into account during his cleaning of the fruits defects, including stains that could affect peel and pulp, and from which scars and bruises are the most common and serious. Certain defects that affect the pulp and are considered critical are bruises, which are considered more severe than stains affecting the peel.

After washing and preparation of clusters, it is necessary to take the fruits to a tank containing alum, or alum-stone, and there they must remain for at least 15–30 minutes. This treatment is for latex elimination. Good water circulation is necessary to avoid latex accumulation in the water. This condition is fundamental to a good fruit processing. Water pressure in the tank must be moderate and not excessive. Crowns (clusters or hands) should remain constantly submerged in water to obtain an effective latex elimination. Static water tanks must be changed whenever they reach high latex levels. Tanks must be 3/4 full of their capacity with fruit. After this operation the fruit is taken to the weighing zone.

#### **7.6. Weighing zone**

The persons responsible for fruit weighing should also wear gloves and should eliminate fruits with defects. Fruit must be carefully handled and they must be set in a bucket where they are distributed by size to facilitate better drying and packing. Buckets should be directly set in a balance to record the required weight for each package.

The main postharvest problem when working with banana hands<sup>r</sup> or fingers is crown decay, collar or tip decay, caused by a diverse number of fungi. This problem demands a special fungicide treatment to avoid their rapid appearance, which lowers their commercial value, especially in high temperature zones or when bananas have not been refrigerated. Extra fungicide treatment may be necessary depending on the type of market. This process is made after fruits are weighed and when they are still in the bucket. Mertect is commonly used to avoid insect problems (see fumigation). The amount of insecticide or fungicide depend on the number of packages or requests to be processed. They are added to the water with alum. Water changes are normally made during the day when high volumes of fruits or dirty fruits arrive at the packinghouse.

#### **7.7. Quality evaluation**

Large banana producers generate fruit according to their client's request, which must be a guide to their production and handling. Fruit quality is evaluated at four levels:

1. In clusters, before processing.
2. After packing and before their transportation.
3. At shipping and at the marketing site.
4. After the ripening process.

These evaluations are used to help detect those factors that negatively affect quality and to discard defective fruit. They also allow supervisors to take corrective decisions to improve amount and quality from the field to its last destination.

### **7.8. Fruit quality classification**

The main defects in banana can be due to damage caused by fruit handling, insects, micro-organisms, adverse environmental conditions, chemical products used and fruit selection, as follows:

- Cluster mishandling once harvested. From the moment of harvest clusters must receive careful handling, otherwise mishandling directly affects the fruit by the appearance of defects such as handling scars (broken collar, bruises, latex stains, tip or flower damages).
- Damages caused by insects and other animals.
- Losses by micro-organism. The most common are crown mould, crown rot and finger-stalk rot, modulo, cigar-end rot, anthracnose, Johnston spot or pitting disease, sigatoka disease, black heart, black tip, brown spot or diamond spot, dothiorella rot, freckle phytophthora finger rot, pink mould rot, speckle or swamp spot, squirter disease, watery soft rot, etc.
- Environmental and genetic conditions. The most important are yellow tip, maturation spot or cracked fingers.
- Chemical damage. These include non-tolerable or non-accepted chemical residues, especially when produce are subjected to exportation and chemical burns.
- Selection damage. Leaf scars, sun burn, short finger, finger weight, slicer cut, deformed hand, fingers malformations, crown bruises, end scar, bad maturity index.
- Miscellaneous. There are several characteristics that buyers identify according to the different regions such as peel and pulp colour, peel thickness, size, peel adherence (i.e. peeling facility), pulp texture (grainy or soft when fried), flavour, sugar or starch content, adequate thickness (for 'sancocho' in Colombia), etc.

## **8. QUALITY INDICES AND STANDARDS**

Quality indices for bananas include finger length and form, and freedom from defects such as insect injury, physical damage, scars, and decay.

Several factors can reduce the quality of banana fruit including skin abrasions, bruising, and decay. Abrasions result from skin scuffing against leaves or other fruits or surfaces of the packages or of handling equipments. The exposure to low relative humidity (<90%) increases water loss from scuffed areas, and promotes the development of brown to black colour.

Quality regulations depend on the buyer and market, help assure absence of defects, and its presentation fulfils certain specifications. Size or grade refers to

finger length and its width. Presentation involves size and hand or finger arrangement.

Fruit defects include stain that affects peel and pulp, and scars and bruises, which are the most common and serious ones. Scars are classified as slight, moderate and severe. Certain defects that affect the pulp, such as bruises are considered critical. Peel defects are classified as major and minor. Persons involved in this process should have knowledge of quality regulations demanded for the different destination markets. The following are banana quality specifications:

- Appearance. Fresh fruit must be green, clean and uniform at the adequate harvest maturity and size at the time of shipment.
- Condition. Fruit must be firm, dark green, without cracks or cracked tips.
- Tolerances. Depending on the buyer and the market; little and dry scars caused by insects might be acceptable on a maximum length of accumulated 4 cm area. Fresh scars caused by mechanical damages are not tolerated.
- Size. Measured at the central part diameter and convex fruit region length along the outer curve from the growing end up to the peduncle base, where the 'eating part' ends. Minimal finger length and diameter are 25 cm (tip to pulp) and 3.8 cm (48/32 in), respectively (NMX, 1995) depending on the buyer. Minimal finger in the cluster length is 22.5 cm (tip to pulp) depending on the buyer.
- Calibre. Minimum and maximum for finger are 38 mm and 59 mm, respectively.
- Weight. The minimal weight per finger should be 250–350 g.

Mexican official standards classify banana fruit quality as extra, first class and second class. All of them must consist of complete fingers, firm, fresh appearance, healthy, excluding all those affected by insects, rots or altered in such a way that they are not proper for human intake. Fruits should be clean, with no visible extra material (i.e. soil, stains or organic matter residues). They should not have any off-odours or off-flavours, maturity stage enough to bear handling and to be able to ripen in storage and to present such a development or condition which allows them to bear transport and handling, and to arrive in proper conditions. Extra quality bananas must have the typical shape and yellow colour when ripe. They must be uniform with respect to colour and size and to fulfil the above-mentioned specifications. They should not have defects, except for some superficial defects, which do not affect their general appearance, their preservation or container presentation. All of these features must be visually assessed.

First class banana fruits may have minor defects as long as they do not affect the general fruit appearance, quality, as above and they must not affect pulp quality. Such defects could be sun and heat damages. Minor defects on peel could be rubs, latex stains, scabs, and superficial stains not bigger than 1.5 cm<sup>2</sup>. These areas are verified using a millimetre scale. Those defects must not affect fruit pulp. Second class bananas cannot be classified in the above groups but they satisfy minimal sensory specifications. Nevertheless they should fulfil variety special features with regard to shape and development, i.e. rubs, scabs in a 1.51 cm<sup>2</sup> and 2.0 cm<sup>2</sup>. These defects should not affect the pulp. Bananas in this class are frequently sold locally.

### **8.1. Tolerance specifications**

According to Mexican standards, each produce container must have a maximum of 5% tolerance in fruit unit number or mass that does not fulfil all the specifications required for extra class but does satisfy specifications of the first class. First class bananas allow a 10% tolerance for those fruits that do not fulfil this class requirement but they have the second-class banana specifications. Second class bananas allow 5% in units or mass to those fruits that do not fulfil this class specifications but do not exhibit defects which alter their quality. There are also tolerances to fruit size and they are similar to those mentioned above with respect to off-sized produce percentages.

Sampling must be done by the supplier and the buyer based on standards. Whenever numbers of units in the container are known, percentage calculations must be determined based on fruit count. If this number is unknown, calculations must be made on the basis of sampled net fruit mass relative to the net container mass or by means of any other equivalent method.

Containers to be sold to the final consumer with contents that are not externally visible must have the nature of produce and its variety specified by means of a mark or label.

Containers for retail sales must carry at least the following printed or labelled, legible, indelible, and visible information: exporter identification, packing house and/or producer's name (address or trade identification), type of produce (its name, especially if the container contents are not very visible), variety's name; country of origin and its national denomination, regional, local, commercial identification, quality grade or class, size, number of units, and the container's net weight (in kilograms).

Containers must satisfy quality, hygiene, ventilation and resistance properties to insure appropriate produce manipulation, transport and preservation. They must be free of any strange material or odour. Container content must be homogeneous, and the bananas must have the same origin, class, variety, size, and/or commercial type.

For extra class fruits, the contents of each container must fulfil quality standard specifications and they must have homogeneous maturity stage and colour. A container's visible part must be representative of the remaining content.

## **9. PACKAGING AND PACKAGES**

Packages have very important roles in presentation, as well as for handling. Good packaging enhances consumer acceptability assuring better selling prices and extending the produce's shelf life (Montero, 1998). Bananas must be packed in such a way that convenient protection is guaranteed. Bananas are traditionally marketed by clusters or fingers. Materials used within the container must be new, clean, and of a quality that avoids produce external or internal damage. The type of package to be used must be defined in order to enhance good prices. The use

of materials, especially paper or seals with commercial specifications, is allowed in the container as long as labelling or printing is made with non-toxic inks or glues. Packages must be made of special material which guarantees adequate produce handling and preservation.

In choosing the type of container to be used, it must be considered that if the client wants to store the produce in a cold place, package dimensions need to be standardised for cold storage. This may also be a consideration if stowages are to be used in retail stores or supermarkets. Boxes should keep a relationship with these dimensions. Normally bananas are packed with a net weight of 18–20 Kg with 4 to 5% additional fruit required to compensate for any weight loss during storage and transport. Package overfilling should be avoided because container materials may rub fruits thus producing mechanical damage, which will be noticed as peel darkening and disease development. Fruits must never be forced inside the package.

### **9.1. Type of packages**

Packages are fundamental for protecting fruit all the way to the final destination. The most appropriate are:

1. Boxes or plastic baskets 60 cm wide by 30 cm high that may be overlapped to facilitate their transport. These boxes contain a cardboard within their base and sides as well as perforated plastic film to reduce any friction.
2. Two piece carton boxes, with a telescopic lid, and upper and lower vents. They also have venting holes in their lateral walls and two holes located at each end to lift the boxes. Box dimensions vary according to the final market. The lid must be correctly set in such a way that it coincides with the venting holes.
3. Open boxes to exhibit fruits are also used in the banana market.

The most common package used for banana is a corrugated fibreboard carton lined with polyethylene, with a capacity of 18 kg. Boxes are then palletised and either stored in a cold room, or loaded into a pre-cooled transport container.

The use of polyethylene film inside the box is commonly used. Fruit must be packed with peduncles attached to the narrow box walls. Fruits must be carefully placed to eliminate movement, and it should never be forced into the box or overfilling it to avoid the rubbing box's walls that can cause scars, peel darkening and consequent disease development.

Bananas may be packed by fingers or clusters. Packers are the last persons who touch the fruit and therefore they should know very well the tolerances for quality. Special care should be taken to avoid piling up more than 5 boxes. Boxes must be carefully placed over woodpiles. Once boxes are piled up they must be tied with nets or metal bands to avoid any box movement. Packages, especially those intended for export market, should be designed in such a way that air circulation is allowed when boxes are piled up to prevent ethylene accumulation, as well as to maintain a uniform temperature.

## 10. TRANSPORTATION

Horticultural produce is generally grown in places located far away from the consuming or processing centres. In many cases, transportation is the most expensive operation in the commercialisation chain. Hence, means of horticultural produce transportation is determined by the distance, produce perishability and value, as well as producer's economical affordability and the production region's degree of development. Bananas need special packing and transportation conditions in order to decrease risks of decay. During transportation, fruits are exposed to movement, vibrations, impacts, pressure, temperature variations and changes in relative humidity. Therefore, transportation conditions must minimise all factors influencing fruit deterioration. There are diverse ways of fruit transportation. Sailcloth covered and sometimes uncovered trucks or wagons are used locally or at a national level. Such transportation means have some disadvantages because they cause bruises on fruits due to rubbing against the vehicle's floor, with the sailcloth or with the sides of the vehicle. Vehicle cushioning may be a problem due to the highway conditions. Humidity losses due to the air velocity and high temperatures to which fruits are exposed may accelerate ripening. Another means of fruit transportation is in bulk, which means that fruits are transported as complete clusters or fingers. This type of transportation causes fruit damage due to vibration and compression.

In each packinghouse there should be a carrier person to carefully take packages and to avoid fruit mishandling when placing them into the vehicle. Boxes should never be thrown, dropped or hauled; they should be carried by the box holes made for that purpose and they should not be tipped or turned upside down so that they are not damaged. Well-aerated vehicles, with clean floors, equipped with whole and waterproof sailcloth are acceptable as good transportation means.

Fruit transport trucks should follow these regulations:

- They should not carry fruit from more than three orchards.
- There must not be more than five boxes of fruit in a stack.
- Sailcloth should be in good condition. The back part must be covered to avoid dust or rain contamination of the fruit.
- In order to avoid fruit damage, moderate vehicle speed must be used during transportation.
- Regulations for merchandise shipping and delivery must be respected.
- Transportation should preferably be made during night hours.

It is important to protect fruits placed on vehicle's floors and walls. Leaves can be used after each cluster is placed and more leaves are placed over clusters to avoid direct fruit friction.

Transportation vehicles should provide adequate hygienic conditions, protection and comfort with the objective of minimising quality losses.

Land transport, i.e. by highways, is the most commonly used. It allows the greatest produce mobilisation over short and long distances, even from 'door to door'. Also, it facilitates loading and unloading operations, but in rainy seasons there may be some difficulties due to poor road conditions or due to the lack of vehicles in peak harvest seasons. During transport it is convenient to humidify fruits to

avoid losses due to fruit dehydration. Refrigerated vehicles able to cool down the fruit from 25 °C to 13–14 °C are needed for banana transportation and storage.

Railroad can be used for long distance transport, in view that their cost is low, although refrigerated cars are required for this purpose. In this type of transport banana leaves are not used to avoid dissemination of sigatoka disease.

Water transport (rivers, oceans) is commonly used especially for export. There is an increase in the use of refrigerated ships with systems for air circulation. Aboard ships, the fruit is commonly transported in containers, each of which may have an independent refrigeration system. In places where there are no pre-cooling facilities, fruit may be directly packed in the refrigerated container to decrease fruit temperature. During palleting, packages should be piled up in columns, making sure that air can circulate through the base and the next package's lid. It is necessary to use corner protections and metal strips, bands, or to place plastic hoops around pallets in order to reinforce platforms and to stabilise packages. If piling on platforms cannot be done, packages can be bulk loaded, i.e., placed package by package on the floor, one over another by columns.

Air transportation has some disadvantages:

- High costs.
- Flight interruptions due to bad weather conditions.
- Long distances from airports to production or unloading centres.
- Limited space availability in airlines.
- Continuity is required in the use of this service.

Therefore, choosing the most suitable transportation means to move fruit must involve the following considerations:

- Roads and highway conditions.
- Transportation type availability.
- Fruit characteristics.
- Travel duration.
- Packaging systems.
- Transportation cost and availability.
- The number of loading and unloading sites.
- Delivery schedule.
- Freight costs.
- Produce sale price.

For loading and unloading it is suggested to:

- Avoid bruising during loading and unloading.
- Avoid fruit exposure to rain and heat.
- Minimise package movement during transportation.
- Place the heavier and firmer packages in the lower part of the vehicle in order to avoid mishandling.
- Load during the coolest part of the day or during the night.
- Keep the fruit under refrigeration and high relative humidity.
- Park the vehicle at shaded sites.

- Avoid transporting low quality product. Costs will be high.
- Transporting fruits in sailcloth-covered vehicles will protect them against sun, rain, dust, avoiding dehydration and bruises.
- Use roads and highways that are in good conditions, even when this makes travel longer.
- Keep vehicles in very good hygienic and mechanical conditions.

Transportation costs will depend on:

- The volume of transported fruits.
- Travel distance.
- Highway conditions.
- Availability of transport units.

Important transportation problems:

- Vehicles with high maintenance costs.
- Vehicle conditions that will not guarantee produce delivery.
- Difficult topography along with roads and highways in bad condition.
- Production seasonality and spreadability that does not guarantee a continuous stock.
- There is no rational use of the parking lot at the different production sites.
- Produce perishability makes mobilisation very risky.
- Untimely pressure by intermediary vehicles owners upon the producers.

## 11. STORAGE

Fruit storage is a way to preserve quality after harvest for a specific time before its sale or consumption. Systematic storage is a part of a postharvest handling chain and it constitutes a very important tool either for the local or export marketing (Hardenburg et al., 1986). Export bananas should remain mature (green) until they reach their last destiny, which may last from just few days to a few weeks, depending on the distance and transportation method.

During the period between harvest and consumption, temperature control is the most important factor for maintaining produce quality. When they are separated from the mother plant, fruits, vegetables and flowers are still living tissues that breathe. The lowest possible temperature increases shelf life by decreasing respiration rate, metabolic reactions related with respiration heat, ethylene production and action, water loss and wilting, softening, chlorophyll degradation, undesirable metabolic changes, fungal attack and bacteria and yeast infections (Lizada et al., 1990). Decay rate can be decreased without altering the ripening process of the fruit (Burdon, 1997). Temperature is the most important factor which influences ripening and decay processes, and therefore refrigeration is the most important technique to preserve perishable horticultural crops including bananas. Refrigerated rooms for the storage of fresh fruits and vegetables should generally operate within very narrow temperature ranges in space and time, with the objective of getting a very long storage period, to avoid freezing injury and physiological disorders, as well

as to minimise transpiration (Burdon, 1997). Temperature control is of great importance, because a suitable low temperature storage extends the life of those fruits that need to be transported over a long distance. For many tropical and subtropical commodities, optimum/minimal storage temperature is within 10 and 15 °C, and therefore their storage life is usually short. It is important to know each variety's storage behaviour in order to establish optimal temperature range to minimise physiological activity without causing chilling injury.

In general, the optimum storage temperature for most of the cultivated bananas is 13 to 14 °C, depending on the variety, maturity stage, and preconditioning treatments at the packinghouse, with a relative humidity between 90–95%. Maintaining adequate air circulation during storage and transport is critical to maintain adequate and uniform temperature and gas concentration. These conditions delay softening and water loss, and insure a postharvest life of 1–4 weeks (Abdullah and Pantastico, 1990). Lower temperatures cause chilling injury and higher temperatures accelerate ripening and senescence. The optimum storage temperature for ripe 'Gros Michel' bananas is 13 °C, while 14 °C is the optimum storage temperature for 'Valery' bananas (Hardenburg et al., 1986). 'Valery' bananas stored at 11 °C showed some browning, grooves and pitting. Maturity advanced slowly and the colour of the peel was dull yellow even when the fruit was completely ripe. 'Cavendish' bananas stored at 14–18 °C exhibited a more intense green colour than those stored at higher temperatures (Rahman et al., 1995). 'Robusta' bananas can only be stored at 15–20 °C for three weeks without affecting their quality (Krishnamurthy, 1989).

Relative humidity affects produce quality. Low humidity stimulates water loss and wilting. A high relative humidity is beneficial for wounds healing process, however, it may also promote fungal development.

## 12. CHILLING INJURY

Bananas are very sensitive to chilling injury (CI), when the fruit is exposed to temperatures below 13 °C. CI symptoms include surface discoloration, dull or muddy colour (instead of the bright yellow colour), subepidermal tissues reveal dark-brown streaks, failure to ripen, and flesh browning, in severe cases. CI symptoms can appear after exposure to low temperature for a few hours to a few days, depending on cultivar, conditions and handling practices before harvest, maturity stage, and temperature. For example, moderate CI will result from exposing mature-green bananas to one hour at 10 °C, 5 hours at 11.7 °C, 24 hours at 12.2 °C, or 72 hours at 12.8 °C. Low temperature injured fruits become very sensitive to mechanical injury and to decay.

## 13. PATHOLOGICAL DISORDERS

Important pathological disorders that can affect banana fruit include crown rot, anthracnose, stem-end rot and cigar-end rot. Crown rot is caused by one or more of the following fungi: *Thielaviopsis paradoxa*, *Lasiodyplodia theobromae*,

*Colletotrichum musae*, *Deightoniella torulosa*, and *Fusarium roseum*. These attack the cut surface of the hands, and the fungi grow from the rotting hand tissue into the finger neck, and down into the fruit. Anthracnose is caused by *Colletotrichum musae*, and becomes evident as the bananas ripen, especially in wounds and skin splits. Stem-end rot is caused by *Lasiodiplodia theobromae* and/or *Thielaviopsis paradoxa*, which enter through the cut stem or hand. The invaded flesh becomes soft and water-soaked. Cigar-end rot is caused by *Verticillium theobromae* and/or *Trachysphaera fructigena*, where the rotted portion of the banana finger becomes dry and tends to adhere to the rest of the fruit, and appears as the ash of a cigar.

#### 14. MODIFIED AND CONTROLLED ATMOSPHERES

Atmosphere composition affects the postharvest life and quality of produce. Storage period may be extended if oxygen and carbon dioxide levels are modified. It is common to resort to this storage technique as a low temperature storage complement. Some gases, emanated from the fruits themselves may accumulate in the storage atmosphere, affecting fruit postharvest life and quality. The most important are carbon dioxide and ethylene.

Controlled (CA) and modified atmosphere (MA) involve the creation of different atmosphere from the normal one. Carbon dioxide, oxygen, nitrogen, ethylene and carbon monoxide may be manipulated in both cases. In the case of a CA, gases are precisely controlled, i.e., by means of special valves to dosify them and analysers that measure the exact amounts of each of them. MA consists only in altering the normal atmospheres without a precise gas control, i.e., by just letting produce breath, lowering oxygen levels by using it for respiration and increasing CO<sub>2</sub> by letting its accumulation (Abdullah and Pantastico, 1990).

One of the most common ways to create a modified atmosphere is by the use of polymeric films as gas exchange barriers. There is a big list of films with these characteristics, different with respect to their permeability to different gases and water vapour, easiness to seal, mechanical resistance, product compatibility, etc. Suitable film is selected depending on the type of food and needed atmosphere (Yahia, 1992, 1997, 1998).

Modified (MA) and controlled (CA) atmospheres are very effective for delaying the ripening and for prolonging the postharvest life of mature-green bananas. These techniques are commonly used, especially during marine transport of bananas. The most common technique used is called 'Banovac', which comprises in packing the fruit in a polyethylene liner of about 0.04 mm (1.5 mil) thickness, then the bag is evacuated, commonly using a house vacuum cleaners, and sealed. Only green fruit should be used, and it is essential to avoid punctured bags. Ideal gas concentrations are 2–5% O<sub>2</sub> and 2–5% CO<sub>2</sub>. MA and CA reduce respiration and ethylene production rates.

Potential postharvest life of mature-green bananas are 2–4 weeks in air and 4–6 weeks in MA/CA at 13–14 °C.

It is important to avoid the exposure of fruit to concentrations less than 1% O<sub>2</sub>

and/or higher than 7% CO<sub>2</sub>, which may cause fermentation, undesirable texture and flavour.

M/CA extends the storage life of green bananas (Elyatem et al., 1984; Brown, 1981; Kanellis et al., 1989; Liu, 1976a; Liu, 1976b; Liu, 1970; Mapson and Robinson, 1966; Quazi and Frebairn, 1970; Satyan et al., 1982a; Satyan et al., 1982b; Scott, 1975; Scott, 1971; Scott and Chaplin, 1978; Scott and Gandanegara, 1974; Scott et al., 1970; Scott and Robert, 1966; Smock, 1967; Woodruff, 1969b). Bananas respond very well to M/CA when the fruit is at the pre-climacteric stage (Smock, 1979). Optimum atmospheres differ for different cultivars but are about 2 to 5% O<sub>2</sub> and 2 to 5% CO<sub>2</sub>, and optimum temperature for M/CA storage is 13 °C (Woodruff, 1969b). Cooking bananas and plantains have similar CA requirements (Satyan et al., 1982b). Atmospheres containing 5% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> were found to be suitable for 'Gros Michel' bananas held for 20 days at 12 °C (Wardlaw, 1940). 'Lacatan' and 'Dwarf Cavendish' bananas were kept for 3 weeks in atmospheres containing 6 to 8% CO<sub>2</sub> and 2% O<sub>2</sub> at 15 °C (Smock, 1967). The recommended atmosphere for 2 Malaysian cultivars of banana at 20 °C and 80% RH was 5 to 10% CO<sub>2</sub> and a continuous removal of ethylene (Broughton and Wu, 1979). Atmosphere of 1% O<sub>2</sub> inhibited ripening in green bananas and was considered as the lower limit at 15.5 °C (Parson et al., 1964). O<sub>2</sub> concentration less than 1% cause fruit injury which include dull yellow to brown skin discoloration, failure to ripen, flaky gray flesh, and off-flavours (Parsons et al., 1964). However, 1% O<sub>2</sub> was reported by other researchers (Mapson and Robinson, 1966; Chiang, 1970) to result in poor quality and more stalk rot. Furthermore, research by Hesselman and Freebairn (1986) indicated that O<sub>2</sub> levels less than 2.5% affect the taste of 'Valery' bananas. CO<sub>2</sub> concentration higher than 5% are reported to result in undesirable flavour and texture after fruit ripening (Woodruff, 1969b). CO<sub>2</sub> level of 10% was considered to be the upper limit for 'Gros Michel' bananas (Gane, 1936).

Several experiments were conducted with storage of bananas in CA sealed rooms (Woodruff, 1969b). Rooms were flushed with N<sub>2</sub> to reduce the O<sub>2</sub> level and supplemental CO<sub>2</sub> was added. Water scrubber was used to control the CO<sub>2</sub> concentration. Purifiers containing brominated, activated carbon were used to absorb volatiles (including ethylene). CA markedly reduced the crown rot. Woodruff (1969b) listed 4 advantages of CA storage of bananas including (1) fruit can be held for long periods without significant ripening or turning. (2) lower rots and moulds. (3) maintains a fresher appearance fruit, and (4) more flexibility in coping with glutted markets. However, there has been no commercial CA storage for bananas. Bananas are available all year around, and therefore there was no need for long-term storage. Gas tight CA chamber would have to be belt aboard marine ships, since most of the postharvest life of bananas is maintained on transit. In the past this was not technologically feasible, however, the recent advances in CA technology and marine containers allow the application of CA aboard marine ships.

MA has been used commercially for the last 3 decades during marine shipments of banana (Woodruff, 1969a; b; Yahia, 1997; 1998). In this system, green fruits are usually packed in polyethylene bags of about 0.04 mm (1.5 mil) thickness, which are then evacuated (usually using a vacuum cleaner) and sealed (Woodruff, 1969a). High temperature at the time of evacuation accelerate the estab-

ishment of the desirable atmosphere (Woodruff, 1969b). The atmosphere in these bags usually averages about 2.5% O<sub>2</sub> (1 to 4.5%) and 5% CO<sub>2</sub> (4 to 6%) after 3 to 4 weeks. This system has been called 'Banovac' by United Fruit Company (Smock, 1979; Woodruff, 1969b). Bananas can be held satisfactory for 30 days by this method without ripening, and can be maintained green for 60 days but rots increase and quality declines after 30 days (Woodruff, 1969b). Fermentation problems have occurred in up to 1% of fruits shipped in this system (Woodruff, 1969a). Only green fruits should be used, and care should be taken not to use punctured bags. Punctured bags will not allow the development of an appropriate atmosphere. Ripe fruits would increase the accumulation of ethylene inside the bags, and would further stimulate fruit ripening. Ethylene concentration of 10 ppm accelerated the ripening of 'Valery' bananas (Woodruff, 1969b). A concentration of 10 ppm or more of ethylene can also stimulate the softening of green fruit (Chiang, 1968), a condition known as 'soft-green' (Woodruff, 1969b) or 'green ripeness' (Scott, 1975). High temperature and high CO<sub>2</sub>, and low O<sub>2</sub> in the storage atmosphere were suggested to be the main factors causing this disorder, however, the exact mechanism is not fully understood (Zhang et al., 1993). The use of ethylene absorbent agents such as potassium permanganate absorbed on aluminium silicate or vermiculite inside the bags can prevent this disorder and prolong the postharvest life of the fruit (Liu, 1970; Scott, 1975; Scott et al., 1968). Ethylene removal with brominated carbon was found to extend the storage life of 'Lacatan' and 'Cavendish' bananas held in 2–3% O<sub>2</sub> and 8% CO<sub>2</sub> (Smock, 1979), and was found to be more effective than using molecular sieve 5A in a continuous air and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> stream (Chiang, 1968). The use of MA for bananas was found to prolong their storage life even at ambient temperatures (Scott and Gandanegara, 1974).

The use of sealed polyethylene (0.1 mm thickness) containing 100 g vermiculite impregnated with a saturated solution of KMnO<sub>4</sub> allowed a storage life of 'Williams' bananas for up to 6 wks at 20 to 28 °C and 16 wks at 13 °C (Satyan et al., 1982a, b). Storage of green mature 'Cavendish' bananas in low density polyethylene bags (0.05 mm thickness) for up to 30 days at 8, 11 and 14 °C developed an in-package atmosphere of 3 to 11% O<sub>2</sub> and 3 to 5% CO<sub>2</sub> (Hewage et al., 1995). However, these authors reported that these storage conditions did not affect ripening and sensory quality, nor did alleviate CI symptoms developed at 8 and 11 °C. 'Emas' bananas stored in polyethylene bags (0.04 mm thickness) for 6 days at 24 °C generated an atmosphere of up to 3.015% C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, up to 14.6% CO<sub>2</sub>, and as low as 2.9% O<sub>2</sub> (Tan et al., 1986). Accumulation of 10% CO<sub>2</sub> or more, especially from day 3 to day 6, and an O<sub>2</sub> concentration below 2% in the bags caused abnormal ripening when fruit was ripened later in air. Fruit had skin and pulp darkening, and softening of the inner portion of the pulp, even though the outer portion remained hard. Water insoluble protopectins decreased, and water soluble pectin and pectates increased in wrapped fruits. The authors suggested that a minimum of 10% CO<sub>2</sub> for few days is required to cause injury in 'Emas' bananas. Storage life was doubled in the absence of an ethylene absorbent and tripled when an absorbent (potassium permanganate on aluminium oxide) was used. Several cultivars of cooking banana (Bluggoe, Pacific plantain, Blue Lubin, and Pisang Awak) behaved similarly to the dessert cultivar 'Cavendish' when stored in poly-

ethylene bags (0.1 mm) with or without an ethylene absorbent (potassium permanganate on aluminium oxide) at 7, 13, 20, and 28 °C (Satyan et al., 1982b). The storage life increased by a factor of two in the absence of an ethylene absorbent and a factor of three in the presence of the ethylene absorbent. CO<sub>2</sub> concentration inside the packages increased up to 15%, and concentrations as high as 32% were reported at the end of storage. Packaging with or without ethylene absorbent had no effect on the incidence of CI neither in the cooking banana cultivars nor in 'Cavendish'. The authors claimed that this method of sealing in polyethylene bags 'appears to be an alternative method to refrigeration'.

Jiang et al. (1999) studied the effect of 1-MCP (1-methylcyclopropane), combined with polyethylene bags on banana fruit ripening, and found that treatment with 1-MCP delayed peel colour change, as well as respiration and ethylene evolution suppression. Therefore, application of 1-MCP combined with the use of polyethylene films could be a technological alternative to transport green banana fruits for long distances.

Liu (1976a) suggested pre-treatment of the fruit with ethylene at the production or packing site before storage or shipping, to avoid post shipping treatment due to high costs, and to provide even ripening. 'Dwarf Cavendish' pre-treated with ethylene and stored for 28 days in 1% O<sub>2</sub> or in 0.1 atmospheric pressure at 14 °C remained green and firm until the end of storage, and started to ripen almost immediately after being placed in air at 21 °C without additional ethylene treatment. However, the period of ethylene pre-treatment is critical and should not exceed a 'threshold length of time (TLT)'. The TLT is defined by Liu (1976b) as the minimum time required for a fixed concentration of ethylene treatment to induce banana ripening response. Only bananas which had been pre-treated with ethylene for a period equal to TLT were successfully stored in CA (Liu, 1976a). Neither CA nor LP could prevent the ripening of bananas pre-treated with ethylene for a period slightly longer than TLT. Fruits are not uniform in their TLT. Commercially mature bananas may have TLT between 4 and 20 hr, and a test for TLT requires 1 to 2 days (Liu, 1976b). Therefore, from a practical point of view the author concluded that it would be extremely difficult to select large lots of fruit with uniform TLT, and thus the potential hazard of fruit ripening during storage or shipping after excessive ethylene pre-treatment jeopardise the commercial applicability of this method.

Treatment with Pro-long (a mixture of sucrose esters of fatty acids and sodium salt of carboxymethylcellulose) extended the shelf-life of bananas (Banks, 1984a; Lowings and Cuts, 1982).

'Gros Michel' bananas held in a LP of 150 mm Hg at 15 °C were maintained longer in a better quality than those held in normal pressure (Burg and Burg, 1966). Fruits held in LP of 760, 250, and 80 mm Hg at 14 °C were reported to be maintained for 30, 60, and at least 120 days, respectively. The authors reported that fruits had an acceptable texture, taste, and aroma, and no injury.

The quality of green bananas was not affected when fruits were held for up to 7 days in 100% N<sub>2</sub> at 15.5 °C, but had dark-brown to black skin blemishes when fruit was held for 10 days (Parsons et al., 1964). After 4 days in 100% N<sub>2</sub> at 15.5 °C, fruits ripened to a normal colour and flavour in 13 days at 20 °C. However,

fruit failed to ripen in air, and developed decay, brown skin discoloration, and off-flavour after storage in 100% N<sub>2</sub> for 7 days. Fruits ripened normally in air at 20 °C after being held in 99% N<sub>2</sub> and 1% N<sub>2</sub> at 15.5 °C for 10 days.

Low O<sub>2</sub> (2.5%) suppressed the activity of acid phosphatase and the addition of 500 µl of ethylene to the low O<sub>2</sub> atmosphere did not reverse this suppression (Kanellis et al., 1989). However this atmosphere either alone or in combination with 500 µl ethylene prevented the decline in the activity of pectin methyl esterase. Kanellis et al. (1989) suggested that there was differential effects of low O<sub>2</sub> on metabolic processes since that the accumulation of sugars increased gradually for 4 days in low O<sub>2</sub>, but no increase in acid phosphatase was observed throughout the duration of the low O<sub>2</sub> treatment. Low O<sub>2</sub> (3%) limited the operation of the Krebs cycle in fruits of *Musa paradisiaca* L., but high CO<sub>2</sub> showed no rate limiting steps in this cycle (McGlasson and Wills, 1972).

Optimum atmosphere composition for bananas is 2 to 5% O<sub>2</sub> and 2 to 5% CO<sub>2</sub>. These atmospheres delay fruit ripening without causing any deleterious effects. CA can maintain the fruit for a longer period in good quality. LP also can maintain the fruit for a longer period in a very acceptable quality. However, due to availability of the fruit almost all year around and because of cost considerations, storage in CA and LP are not commercially used.

Research needs for this fruit include the cost and technological feasibility of the establishment and use of CA, especially on board of sea ships. Metabolic studies to further investigate causes and methods to ameliorate CI symptoms are also needed.

The inadequate use of CA and MA may cause physiological disorders, and even the total produce loss of the product. Too low O<sub>2</sub> levels and/or too high CO<sub>2</sub> levels (depending on the type of produce) can stimulate off-flavours and off-odours due to fermentative metabolites.

## 15. ARTIFICIAL RIPENING

Climacteric fruits, such as bananas, are commonly harvested before they acquire their ideal consumption stage for practical handling purposes. When they arrive at their destiny they are ripened under controlled temperature and relative humidity, and under certain gases action such as ethylene. Low relative humidity activates maturation but increases darkening and wilting (Yanbin et al., 1996). An additional advantage to controlled maturation is the process uniformity.

Bananas ripened on the plant often split, have poor texture, and tend to be mealy, and therefore they are harvested mature-green and ripened at arrival to the market. Banana should be green and firm on arrival to destination.

Ideal conditions for ripening are as follows:

- Temperatures: 15–20 °C
- Relative humidity: 90–95%
- Ethylene concentration: 100–150 ppm
- Duration of treatment: 24 to 72 hours depending on fruit maturity stage, and desired speed of ripening.

- Carbon dioxide concentration should be kept below 1% to avoid ripening inhibition.
- Ripening rooms should be well insulated and sufficiently airtight. Adequate air circulation is needed to provide uniform temperature, and to eliminate the build-up of gases (ethylene and CO<sub>2</sub>).

The ripening process should be controlled depending on the initial stage of maturity of the fruit, the desired final maturity stage, the market demand, and the consumer preference. These aspects can be easily controlled by manipulating the temperature, ethylene concentration, and exposure duration.

Ethylene at a concentrations of 3 to 34% in air by volume (30,000 ppm or higher) is explosive. The maximum concentration needed for ripening is very low compared to the explosive range, but care should be taken to secure its safe use.

In order to insure a good flavour as well as a bright yellow peel colour, green fruits at physiological maturity stage, have to be artificially ripened by ethylene gas injection within sealed ripening chambers and at a controlled temperature. After ethylene application, chamber remains sealed for 24 hours, after which maturity chamber must be aired out, allowing for an atmosphere composition exchange. Under average conditions, ripening period may be as short as 4 days, if high temperatures are used, or it may be extended between 8 and 10 days at lower temperatures (Robinson, 1996). If ripening temperature is rather high ripened fruit will develop soft pulp, while peel colour will remain green-yellow. Inversely, if ripening temperature is lower than 13 °C it will cause peel damage, expressed as a greyish colour. Lack of ripening uniformity can also be caused by low temperatures and insufficient ethylene levels in the chamber (Robinson, 1996).

Artificially applied ethylene accelerates banana maturation at concentrations as low as 0.1 to 1 ppm in some cultivars (Abdullah and Pantastico, 1990). Ethylene at 1, 100 and 1000 ppm for a 24 hour period accelerated the ripening of 'Latundan' bananas in a way related with higher ethylene levels (Inaba and Nakamura, 1986). Ethylene application accelerated banana ripening during their storage at different temperatures by altering peel chlorophyll degradation (Kajuna et al., 1995). Banana texture decreased as a result of ethylene application (Kajuna et al., 1997). Ethrel application as pre- or post-harvest spraying or immersion at 500 ppm proved to be effective in accelerating banana ripening. Fruits ripen within 2–3 after treatment at ambient temperature. Fruit physiological response to ethrel treatment is similar to that of fruits treated with ethylene, although a lower concentration is needed for the latter. Acetylene, an ethylene analogous, simulates ethylene action thus fruit ripening. However, minimal acetylene required to induce banana ripening is 1 ml/L (Abdullah and Pantastico, 1990). Smith and Thompson (1987) studied the effect of acetylene concentrations at different exposure times and different temperatures at the beginning of fruit ripening process. They reported that fruits exposed to acetylene at a concentration of 0.5–1.0 ml/L at 14–16 °C for 72 hours ripened with respect to total soluble solids and pulp firmness.

## 16. RECOMMENDATIONS

1. Produce high quality fruit.
2. Minimise bruising during harvesting, transport and packing.
3. Cool the fruit rapidly to 14 °C.
4. Avoid chilling injury by not exposing the fruit to temperatures below 13 °C.
5. Provide adequate sanitation of handling facilities.
6. Establish adequate control of the ripening process.
7. Avoid using high concentrations of ethylene during the ripening process to eliminate the danger of explosion.
8. Fungicide treatments such as with Imazalil and Thiabendazol are effective for decay control.
9. Modified or controlled atmospheres are very effective for prolonging the life of the fruit, especially during marine transport.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. William J. Etges and Ms. Margot Martin for their critical review of the manuscript, and Ms. Rocio Martinez-Jarque for the drawings.

## REFERENCES

- Abdullah, H., M. C. C. Lizada, S. C. Tan, B. Pantastico Er. and S. C. Tongdee (1990). Storage of banana. In H. Abdullah and B. Pantastico Er. (Eds.), *Banana: Fruit development, postharvest physiology, handling and marketing in ASEAN*. ASEAN Food Handling Bureau, pp. 44–64.
- Abdullah, H. and B. E. Pantastico (1990). *Banana Fruit Development, Postharvest Physiology, Handling and Marketing in ASEAN*. Indonesia pp. 33–103.
- Abeles, F. B., P. W. Morgan and M. E. Saltveit (1992). *Ethylene in Plant Biology*, 2nd ed. Academic Press, New York, pp. 26–83.
- Al-Zaemy, A. B. S., I. B. Falana and A. K. Thompson (1989). Effects of permeable fruit coatings on the storage life of plantain and bananas. *Aspects of Applied Biology* 20: 73–80.
- Anonymous (1980). *Manual de Prácticas Recomendadas para la Precosecha, Cosecha, Transporte, Selección y Clasificación, Envasado y Conservación de Banano en Estado Fresco. Manuales de Prácticas Recomendadas*. Departamento de Normalización e Inspección de Calidad Frutícola. Subdirección Comercial. Comisión Nacional de Fruticultura SARH. PRM-FF-CNF-II. CONAFRUT, México, 56 pp.
- Apelbaum, A., Y. Aharoni and N. Temkin-Gorodeiski (1977a). Effects of sub atmospheric pressure on the ripening processes of banana fruit. *Trop. Agric. (Trinidad)* 54: 39–46.
- Badran, A. M. and L. Lima (1969). *Controlled Atmosphere Storage of Green Bananas*. U.S. Patent 3,450,542.
- Banks, N. H. (1983). Evaluation of methods for determining internal gases in banana fruit. *Journal of Experimental Botany* 34: 871–879.
- Banks, N. H. (1984a). Some effects of TAL Pro-long coating on ripening bananas. *Journal of Experimental Botany* 35: 127–137.
- Banks, N. H. (1984b). Studies on the banana fruit surface in relation to the effects of TAL prolong coating on gaseous exchange. *Scientia Horticulturae* 24: 279–286.
- Belalcazar, C. S. (1991). EL cultivo del plátano en el trópico. In *Manual de Asistencia Técnica*. No. 50. JCA, CIID. Comité Departamental de Cafeteros del Quindío, INIBAP. Armenia, Cali, Colombia. pp. 21–102.

- Broughton, W. J. and K. F. Wu (1979). Storage conditions and ripening of two cultivars of banana. *Scientia Horticulturae* 10(1): 83–93.
- Brown, D. J. (1981). The effects of low O<sub>2</sub> atmospheres and ethylene and CO<sub>2</sub> production, and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid concentration in banana fruits. MS Thesis, University of Maryland, College Park.
- Burg, S. P. and E. A. Burg (1966). Fruit storage at sub atmospheric pressures. *Science* 153: 314–315.
- Burdon, J. N. (1997). Postharvest handling of tropical and subtropical fruit for export. In Mitra (ed.), *Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits*. S. CAB International, London, pp. 1–19.
- Champion, J. (1986). *El Plátano. Técnicas Agrícolas y producciones Tropicales*. Instituto del Libro. 2nd ed. Blume, España, pp. 169–179.
- Chiang, M. N. (1970). *The Effect of Temperature and the Concentration of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> upon the Respiration and Ripening of Bananas, Stored in a Controlled Atmosphere*. Spec. Publ. Coll. Agric. Nat. Taiwan Univ., Taipei, Taiwan, 11: 1–13.
- Chiang, M. N. (1968). *Studies on the Removal of Ethylene from CA-storage of Bananas*. Spec. Publ. Coll. Agric. Nat. Taiwan Univ. No. 20, Taipei, Taiwan.
- Clendennen, S. K., P. B. Kipp and G. D. May (1997). The role of ethylene in banana fruit ripening. In A. K. Kanellis, C. Chang, H. Kende and D. Grierson (eds.), *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene*. 3. High Technology – Vol. 34. NATO ASI Series. Kluwer Academic Publishers. London. pp. 141–148.
- Colinas L. M. T. (1992). Desórdenes fisiológicos de productos hortícolas. In E. M. Yahia and C. I. Higuera (eds.), *Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Limus., Grupo Noriega Editores, México, pp. 65–71.
- Compañía Frutera de Sevilla (1995). *Instructivo de Protección de Fruta*. Santa Marta, Colombia, 47 pp.
- Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias (CCIA) (1996). *Tecnología del Eje Cafetero para la Siembra y Explotación Rentable del Cultivo del Plátano*. Tercer Informe Técnico. Comité Departamental de Cafeteros, Armenia, Colombia, 130 pp.
- Domínguez, M. and M. Vendrell (1993). Ethylene biosynthesis in banana fruit: Evolution of EFE activity and ACC levels in peel and pulp during ripening. *Journal of Horticultural Science* 68(1): 63–70.
- Elyatou, S. M., N. H. Banks and A. C. Cameron (1994). Oxygen concentration effects on ethylene production by ripening banana tissue. *Postharvest Biology & Technology* 4: 343–351.
- Esguerra, E. B., K. Kawada and H. Kitagawa (1993). Responses of Senorita and Cavendish bananas to postharvest control treatments. *ASEAN Food Journal* 8(2): 6–9.
- FAO (2001). *FAOSTAT Database*. FAO, Rome, Italy.
- Fuchs, Y. and N. Temkin-Forodeiski (1971). The course of ripening of banana fruits in sealed polyethylene bags. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 96: 401–402.
- Gane, R. (1936). A study of the respiration of bananas. *New Phytol.* 35: 383.
- Gutiérrez, M. P., L. M. Gómez and G. R. López (2001). Identification of an ETR-1 homologue from mango fruit expressing during fruit ripening and wounding. *Journal of Plant Physiology* 158: 101–108.
- Hardenburg, E. R., E. A. Watada and Y. C. Wang (1986). *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks*. United States Department of Agriculture Handbook, U.S.A., No. 66.
- Hesselman, G. W. and H. T. Freebairn (1986). Rate of ripening of initiated bananas as influenced by oxygen and ethylene. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 94: 635–637.
- Hewage, S. K., H. Wainwright, S. W. Wijerathnam and T. Swinburne (1995). The modified atmosphere storage of bananas as affected by different temperatures. In A. Ait-Oubahou and M. El-Otmani (eds.), *Postharvest physiology and technologies for horticultural commodities: Recent advances*. Institut Agronomique & Vétérinaire Hassan II, Agadir, Morocco, pp. 172–176.
- Ibrahim, K., A. B. Abu-Goukh and K. S. Yusuf (1994). Use of ethylene, acetylene and ethrel on banana fruit ripening. *Journal of Agricultural Sciences* 2(1): 73–92.
- Inaba, A. and R. Nakamura (1986). Effect of exogenous ethylene concentration and fruit temperature on the minimum treatment time necessary to induce ripening in banana fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Sciences* 55(3): 348–354.

- Israeli, Y. and E. Lahav (1987). Banana. In P. S. Monselise (ed.), *Handbook of fruit set and development*. CRC Press Inc., Florida, U.S.A. pp. 45–73.
- Jiang, Y., D. C. Jayce and J. Macnish (1999). Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. *Postharvest Biology & Technology* 16: 187–193.
- Kajuna, S. T. A. R., W. K. Bilanski and G. S. Mittal (1995). Color control in bananas and plantains in storage. Harvest and postharvest technologies for fresh fruit and vegetables. *Proceedings of the International Conference. Guanajuato*. ASAE, México, pp. 601–608.
- Kajuna, S. T. A. R., W. K. Bilanski and G. S. Mittal (1997). Textural changes of banana and plantain pulp during ripening. *Journal of the Science of the Food and Agriculture* 75(2): 244–250.
- Kanellis, A. K. and T. Solomos (1985). The effect of low oxygen on the activities of pectin-methylesterase and acid phosphatase during the course of ripening of bananas. In S. M. Blankenship (ed.), *Proc. 4th Nat. CA Res. Conf.*, Hort. Rpt. No. 126, Dept. Hort. Sci., North Carolina State Univ., Raleigh, NC, pp. 20–26.
- Kanellis, A. K., T. Solomos and A. K. Matoon (1989). Changes in sugars, enzymic activities and acid phosphatase isoenzyme profiles of bananas ripened in air or stored in 2.5% O<sub>2</sub> with and without ethylene. *Plant Physiology* 90: 251–258.
- Krishnamurthy, S. and C. G. Kushalappa (1985). Studies on the shelf life and quality of Robusta bananas as affected by post-harvest treatments. *Journal of Horticultural Science* 60: 549–556.
- Kotecha, P. M. and B. B. Desai (1995). Banana. In *Handbook of fruit science and technology. Production, composition, storage and processing*. Marcel Dekker, Inc. pp. 67–90.
- Krishnamurthy, S. (1989). Storage life and quality of Robusta banana in relation to their stage of maturity and storage temperature. *Journal of Food Science and Technology* 26(2): 87–89.
- Lagunes, T. A. and Rodríguez M. J. C. (1988). *Plátano*. In: *Combate Químico de Plagas Agrícolas en México*, Centro de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza en Ciencias Agrícolas, México, pp 234.
- Laville, B. (1977). *Produce Top Quality Bananas*. Windward Islands Banana Growers Association. Ed., Topical Products Institute, London, 12 pp.
- Liu, F. W. (1978). Ripening banana with ethephon in three polymeric film packages. *HortScience* 13(6): 688–690.
- Liu, F. W. (1976a). Storing ethylene-pretreated bananas in controlled atmosphere and hypobaric air. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 198–201.
- Liu, F. W. (1976b). Correlation between banana storage life and minimum time required for ethylene response. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 101: 63–65.
- Liu, F. W. (1970). Storage of bananas in polyethylene bags with an ethylene absorbent. *HortScience* 5: 25–27.
- Lizada, C. C., A. B. Agillon, L. A. Artes and E. V. Labios, E. V. (1986). Physiological characterization of some banana cultivars subjected to modified atmosphere storage. *HortScience* 21: 811 (Abstract).
- Lizada, M. C., E. B. Pantastico, A. R. Shukor and D. S. Sabari (1990). Ripening of banana. In: *Banana fruit development, postharvest physiology*. Handling & Marketing in ASEAN, pp. 65–83.
- Lowings, P. H. and D. F. Cuts (1982). The preservation of fresh fruits and vegetables. *IFST proceedings* 15: 52–54.
- Mapson, L. W. and J. E. Robinson (1966). Relation between O<sub>2</sub> tension, biosynthesis of ethylene, respiration and ripening changes in banana fruit. *Journal of Food Technology* 1: 215–225.
- McGlasson, W. B. and R. B. H. Wills (1972). Effects of oxygen and carbon dioxide on respiration, storage life, and organic acids of green bananas. *Australian J. Bio. Sci.* 25: 35–42.
- Medlicott, A. P., A. J. Semple, J. Thompson, H. R. Blackbourne and A. K. Thompson (1992). Measurement of color changes in ripening bananas and mangoes by instrumental, chemical and visual assessments. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 69(2): 161–166.
- Montero, E. H. (1998). *Manejo Post-Cosecha y Comercialización del Plátano (Musa spp. Grupo AAB)*. Serie de Paquetes de Capacitación sobre Manejo Post-Cosecha de Frutas y Hortalizas No. 15. Programa Post-Cosecha, Convenio SENA-Reino Unido, NRI. DFID., México, 500 pp.
- Morton, J. (1987). Banana. In *Fruits of warm climates*. Miami, Florida, U.S.A., pp. 29–46.
- Nair, H. and H. F. Tung (1992). Low oxygen effect and storage of Mas bananas (Musa, AA group).

- In W. M. W. Othman, R. Mohamad, S. H. Ahmad and K. K. Chong (eds.), *Recent advances in horticultural science in the tropics*. International Society for Horticultural Science, Wageningen, Netherlands, pp. 209–215.
- Olorunda, A. O. (1976). Effect of ethylene absorbent on the storage life of plantain packed in polyethylene bags. *Nigerian J. Sci.* 10(1/2): 19–26.
- Olorunda, A. O., M. Meheriuk and N. E. Looney (1978). Some postharvest factors associated with the occurrence of chilling injury in banana. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29(3): 213–218.
- Palmer, J. K. (1971). The banana. In A. C. Hulme (ed.), *The biochemistry of fruits and their products*. Chapter 2, Vol. 2. Academic Press, A.R.C. Food Research Institute, Norwich, England. pp. 65–105.
- Parsons, C. S., J. E. Gates and D. H. Spalding (1964). Quality of some fruits and vegetables after holding in nitrogen atmospheres. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 84: 549–566.
- Quazi, M. G. and H. T. Freebairn (1970). The influence of ethylene, oxygen and carbon dioxide on the ripening of bananas. *Bot. Gaz.* 131: 5–14.
- Rahman, N. A., W. Yuqing and K. Thompson (1995). Temperature and modified atmosphere packaging effects on the ripening of banana. Harvest and Postharvest technologies for fresh fruit and vegetables. In: *Proceedings of the international conference*, ed. ASAE. Guanajuato, México, pp. 313–321.
- Robinson, J. (1996). *Bananas and Plantains*. CAB-International, U.S.A.
- Salunkhe, D. K. and B. B. Desai (1984). Banana and plantain. In *Postharvest biotechnology of fruits*. Chapter 4. ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A., pp. 43–57.
- Satyan, S. H., K. J. Scott and D. Graham (1982a). Storage of banana bunches in sealed polyethylene tubes. *Journal of Horticultural Science* 67: 283–287.
- Satyan, S. H., K. J. Scott and D. J. Best (1982b). Effects of storage temperature and modified atmospheres on cooking bananas grown in New South Wales. *Tropical Agriculture* 69: 263–267.
- Scott, K. J. (1975). The use of polyethylene bags to extend the life of bananas after harvest. *Food Technol. Aust.* 27: 481–482.
- Scott, K. J. (1971). Polyethylene bags and ethylene absorbent for transporting bananas. *Agric. Gaz. NSW* 82: 267–269.
- Scott, K. J., J. R. Blake, G. Strachan, B. L. Tugwell and W. B. McGlasson (1971). Transport of bananas at ambient temperature using polyethylene bags. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 48: 245–254.
- Scott, K. J. and G. R. Chaplin (1978). Reduction of chilling injury in avocados stored in sealed polyethylene bags. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 55(1): 87–90.
- Scott, K. J. and S. Gandanegara (1974). Effect of temperature on the storage life of bananas held in polyethylene bags with ethylene absorbent. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 51: 23–26.
- Scott, K. J., W. B. McGlasson and E. A. Roberts (1970). Potassium permanganate as an ethylene absorbent in polyethylene bags to delay ripening of bananas during storage. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 10: 237–240.
- Scott, K. J., B. McGlasson and E. A. Roberts (1968). Ethylene absorbent increase storage life of bananas packed in polyethylene absorbent. *Agric. Gaz. N.S.W.* 79: 52–xxx.
- Scott, K. J. and E. A. Roberts (1966). Polyethylene bags to delay ripening of bananas during transport and storage. *Aust. J. Exp. Agric. & Anim. Husb.* 6: 197–199.
- Senser, F. and H. Scherz (1999). Plátano, banane. In *Tablas de composición de alimentos*. Edición del Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching bei München, ed. Acribia. S.A. España, pp. 367.
- Seymour, G. B. (1993). Banana. In G. B. Seymour, J. E. Taylor and G. A. Tucker (eds.), *Biochemistry of fruit ripening*, Chapter 3. Chapman & Hall, London, England, pp. 83–106.
- Shorter, A. J., K. J. Scott and D. Graham (1987). Controlled atmosphere storage of bananas in bunches at ambient temperatures. *CSIRO Food Res. Q.* 47: 61–63.
- Smock, R. (1979). Controlled atmosphere storage of fruits. *Horticultural Reviews* 1: 301–336.
- Smock, R. M. (1967). Methods of storing bananas. *Philippine Agriculturist* 51: 501–517.
- Smith, N. S. J. and K. A. Thompson (1987). The effects of temperature, concentration and exposure

- time to acetylene on initiation of banana ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40(1): 43–50.
- Tan, S. C. and A. M. Ali (1990). The effect of CO<sub>2</sub> on phenolic compounds during the storage of 'Mas' banana in polybag. *Acta Horticulturae* 269: 389 (Abstract).
- Tan, S. C., P. E. Lam and H. Abdullah (1986). Changes of the pectic substances in the ripening of bananas (*Musa sapientum*, cv. Emas) after storage in polyethylene. *ASEAN Food Journal* 2: 76–77.
- Terranova (1995). Economía, administración y mercadeo agropecuarios. In V. I. Tomo (ed.), *La Enciclopedia Agropecuaria de Terranova Editores, Ltda.* Terranova Editores Ltda. Bogotá, Colombia, 304 pp.
- Theologis, A. (1993). One rotten apple spoils the whole bushel. The role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70: 181–184.
- Theologis, A. and G. Laties (1978). Respiratory contribution of the alternate path during various stages of ripening in avocado and banana fruits. *Plant Physiol.* 62: 249–255.
- Turner, D. W. (1997). Bananas and plantains. In *Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits*. CAB. International, London, pp. 47–83.
- Valdez, E. R. T. and D. B. Mendoza Jr. (1988). Influence of temperature and gas composition on the development of senescent spotting in banana (*Musa sapientum* L. cv. Bungulan). *Philippine Agriculturist* 71: 5–12.
- Wade, N. L. (1974). Effects of oxygen concentration and ethephon upon the respiration and ripening of banana fruits. *Journal of Experimental Botany* 25: 955–964.
- Wardlaw, C. W. (1940). Preliminary observations on the refrigerated gas storage of 'Gros Michel' bananas. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 17: 103–105.
- Wills, R. B. H., S. Pitakserikul and K. J. Scott (1982). Effects of prestorage in low oxygen or high carbon dioxide concentrations on delaying the ripening of bananas. *Australian Journal of Agricultural Research* 33: 1029–1036.
- Woodruff, R. E. (1969a). Overseas transport of bananas. In: Controlled atmospheres for the storage and transport of horticultural crops. Proc. Natl. CA Res. Conf., Mich. State Univ., *Hort. Rept.* 9: 54.
- Woodruff, R. E. (1969b). Modified atmosphere storage of bananas. In: Controlled atmospheres for the storage and transport of horticultural crops. Proc. Natl. CA Res. Conf., Mich. State Univ., *Hort. Rept.* 9: 80–94.
- Yahia, E. M. (1992). Modified and controlled atmosphere technologies. *Proc. I Latin American postharvest technology*. México, pp. 117–135.
- Yahia, E. M. (1993). Modified/controlled atmosphere storage in Mexico. In CA'93. *Proceedings of the Sixth International CA Res. Conf.*, Ithaca, NY, June 14–16, 1993, pp. 570–579.
- Yahia, E. M. (1997). Modified/controlled atmospheres for banana and plantain. In Adel A. Kader, CA'97 *Proceedings, Volume 3: Fruits other than apples and pears*. University of California, Davis, U.S.A., pp. 104–109.
- Yahia, E. M. (1998). Modified and controlled atmospheres for tropical fruits. *Horticultural Reviews* 22: 123–183.
- Yanbin, X., Y. Kubo and R. Nakamura (1996). Effects of humidity on the ripening characteristics of banana fruits. *Journal of the Japanese Society of Food Science and Technology* 43(5): 541–545.
- Zhang, D., B. Y. Huang and K. J. Scott (1993). Some physiological and biochemical changes of 'green ripe' bananas at relative high storage temperatures. *Acta Horticulturae* 343: 81–85.

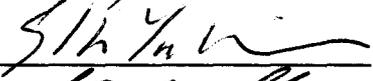
El jurado designado por las  
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

MARÍA DE LOURDES YÁÑEZ LÓPEZ

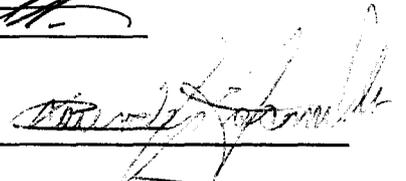
El día 26 de septiembre del 2007

Comité Tutorial:

Director: Dr. Efraín Mercado Pichardo 

Codirector: Dr. Elhadi Yahia Kazuz 

Asesor: Dr. Miguel A. Armella Villalpando 

Sinodal: Dra. Ma. de Lourdes A. Escamilla Hurtado 

Sinodal: Dra. Teresa Reyna Trujillo 

Sinodal: Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano 

Representante del Comité de Doctorado en Ciencias Biológicas:

Dr. J. Alejandro Zavala Hurtado 