



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. ABSTRACT</b>	2
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	3
3.1. Origen, taxonomía del calabacín e importancia económica del cultivo	3
3.2. Recolección, almacenamiento y comercialización del calabacín	4
3.3. Definición e importancia de la alteración fisiológica “daños por frío” (DF)	4
3.4. Mecanismo bioquímico de la alteración	6
3.5. Métodos y estrategias para la prevención y control de los daños por frío	7
3.5.1. Tratamientos físicos	7
3.5.1.1. Modulación de la temperatura de almacenamiento	7
3.5.1.2. Alta humedad relativa	9
3.5.2. Tratamientos químicos	9
3.5.2.1. Recubrimientos comestibles	9
3.5.2.2. Óxido nítrico (NO) y melatonina	10
<b>4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	11
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	12
5.1. Material vegetal y desarrollo experimental	12
5.2.1. Ciclos de calentamiento intermitente (CI)	13
5.2.2. Tratamiento con melatonina (100 $\mu$ M y 1000 $\mu$ M)	13
5.2.3. Almacenamiento en alta humedad relativa (HR)	13
5.3. Evaluación de la incidencia y severidad de los daños por frío	13
5.4. Parámetros físico-químicos y fisiológicos	14
5.4.1. Pérdida de peso	14
5.4.2. Firmeza	14
5.4.3. Medida instrumental del color	15
5.4.4. Sólidos solubles	15
5.4.5. Actividad respiratoria	16
5.5. Parámetros implicados en el metabolismo de los daños por frío	16
5.5.1. Parámetros asociados a daños estructurales en la membrana celular	16
5.5.1.1. Salida de electrolitos	16
5.5.1.2. Tasa de muerte celular	16
5.5.1.3. Contenido en malondialdehído (MDA)	17
5.6.2. Parámetros asociados al estrés oxidativo	17

5.6.2.1. Determinación de los compuestos fenólicos totales .....	17
5.6.2.2. Determinación del contenido total de flavonoides .....	18
5.6.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante total (método del radical libre DPPH) .....	18
5.7. Análisis estadístico .....	19
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
6.1. Parámetros de calidad del fruto.....	19
6.2. Daño por frío e integridad de la membrana .....	23
6.3. Parámetros implicados en la integridad de la membrana .....	25
6.4. Parámetros asociados a los diferentes mecanismos de defensa del fruto.....	28
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>8. CONCLUSIONES EN INGLÉS.....</b>	<b>31</b>
<b>9. VALORACIÓN PERSONAL.....</b>	<b>31</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>36</b>

## 1. RESUMEN

España es uno de los principales países productores de hortalizas, siendo el segundo exportador de calabacín a nivel mundial (después de México), por lo que las pérdidas de calidad asociadas a la aparición de diferentes tipos de desórdenes suponen un gran impacto económico.

El calabacín es un fruto que se recolecta en un estado inmaduro y se caracteriza por mostrar una alta actividad metabólica, que hace que su vida útil sea muy corta. Una forma de prolongar ese potencial de conservación postcosecha es mediante la conservación en temperaturas de refrigeración. Sin embargo, estos productos son altamente susceptibles a sufrir daños por frío (DF), que se manifiestan mediante la aparición de diferentes desórdenes, como puede ser el desarrollo de «pitting» (depresiones de color oscuro en la piel), la pérdida de peso o el ablandamiento de las puntas. En los últimos años se han venido desarrollando diferentes estrategias para el control de este tipo de daños y/o el aumento de la tolerancia del fruto a las bajas temperaturas.

En el presente trabajo se ha comparado la eficacia de 3 tratamientos postcosecha, como son el calentamiento intermitente (21°C durante 24 h tras cada 7 días de almacenamiento), el tratamiento con melatonina (100 µM y 1000 µM/15 min) y la conservación en condiciones de elevada HR (98 ± 1,5 %) para inhibir el desarrollo de los daños por frío en calabacín. Los frutos se mantuvieron durante 28 días a una temperatura de almacenamiento de inducción de daño (3 °C). La respuesta del fruto así como la eficacia de cada estrategia se evaluó tras 0, 7, 14, 21 y 28 días de conservación más 24 h a 21°C, mediante el análisis de diferentes parámetros de calidad de fruto, parámetros asociados a daños estructurales en la membrana celular (contenido en malondialdehído, salida de electrolitos y tasa de muerte celular) y parámetros asociados al estrés oxidativo y mecanismos antioxidantes de defensa (contenido en compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante total). De los tratamientos evaluados, el almacenamiento en elevada HR fue la estrategia más eficaz, consiguiendo frenar el desarrollo del daño casi hasta el final del almacenamiento y disminuyendo el índice de DF de 3,4 (frutos control) a 0,8 (frutos almacenados en elevada HR). Igualmente, se consiguió frenar la salida de electrolitos (13,42% vs. 15,48% en frutos conservados en alta HR y frutos control, respectivamente) y evitar el acumulo de MDA (4,05 µmol/g peso fresco vs. 8,51 µmol/g peso en calabacines conservados en alta HR y frutos control), ambos parámetros asociados a una mayor intensidad de daño. Dicho tratamiento aumentó la tolerancia de los frutos a los DF (relacionada con una menor presencia de compuestos de respuesta al estrés) y redujo la susceptibilidad a la deshidratación, aumentando su vida útil.

De forma contraria a lo observado en otro tipo de frutas y hortalizas, el tratamiento de melatonina, aplicado en sus dos concentraciones (100  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ ), lejos de poder aplicarse como técnica para el control de esta fisiopatía, aceleró el proceso de senescencia del producto y favoreció el desarrollo de los daños en el fruto.

## 2. ABSTRACT

Spain is one of the main vegetable-producing countries, being the second largest zucchini fruit exporter (after Mexico), so the global quality losses associated with the appearance of different types of disorders have a big economic impact.

Zucchini is a fruit that is harvested in an immature state and is characterized by showing high metabolic activity, which makes its useful life very short. One way to prolong that postharvest shelf life potential is by holding at refrigerated temperatures. However, these products are highly susceptible to cold damage, which manifests itself through the appearance of different disorders, such as the development of «pitting» (dark-colored depressions in the skin), weight loss or softening of the tips. In recent years, different strategies have been developed to control the development of this type of years and/or increase the tolerance of the fruit to low temperatures.

In the present work, the efficacy of 3 postharvest treatments has been compared, such as intermittent heating (21°C for 24 h after every 7 days of storage), treatment with melatonin (100  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$ /15 min) and storage under high RH conditions (98  $\pm$  1.5 %) to inhibit the development of chilling injuries in zucchini. The fruits were kept for 28 days at a damage induction storage temperature (3 °C). The response of the fruit as well as the efficacy of each strategy was evaluated after 0, 7, 14, 21 and 28 days of conservation by analyzing different fruit quality parameters, parameters associated with structural damage to the cell membrane (malondialdehyde content, electrolyte leakage and cell death rate) and parameters associated with oxidative stress and antioxidant defense mechanisms (content of phenolic compounds, flavonoids and total antioxidant activity). Of the treatments evaluated, storage at high RH was the most effective strategy, managing to stop the development of damage almost until the end of storage and decreasing the DF index from 3.4 (control fruits) to 0.8 (fruits stored in elevated HR). Similarly, it was possible to stop the release of electrolytes (13.42% vs. 15.48% in fruits preserved at high HR and control fruits, respectively) and prevent the accumulation of MDA (4.05  $\mu\text{mol/g}$  fresh weight vs. 8.51  $\mu\text{mol/g}$  weight in zucchini preserved at high HR and control fruits), both parameters associated with a greater intensity of damage. This treatment increased

the tolerance of the fruits to DF (related to a lower presence of stress response compounds) and reduced susceptibility to dehydration, increasing their useful life.

Contrary to what was observed in other types of fruits and vegetables, the melatonin treatment, applied in its two concentrations (100 uM and 1000 uM), far from being applied as a technique for the control of this physiopathy, accelerated the process of senescence of the product and favored the development of damage in the fruit.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Origen, taxonomía del calabacín e importancia económica del cultivo

El origen del cultivo del calabacín tuvo lugar a principios del siglo XIX y fue la primera calabaza del género *Cucurbita* introducida en Europa (MAPA, 2022). Existen numerosas evidencias de que el género *Cucurbita* es indígena de América (Salunkhe, 2004).

Las hortalizas se pueden clasificar en distintos tipos en función de cual sea su parte comestible: el fruto, la hoja, el tallo, la flor o su parte subterránea. El calabacín pertenece a la familia de las cucurbitáceas y es un tipo de hortaliza de fruto. Las hortalizas de este tipo pueden distinguirse a su vez por su estado de madurez en el momento de la cosecha. Así, se diferencia entre frutos maduros y frutos inmaduros, a este último grupo pertenece el calabacín (*Cucurbita pepo*) (Cantwell y Kasmire, 2007).

El sector hortofrutícola en España se sitúa como uno de los más importantes en el conjunto del sector agrario. Actualmente, cuenta con una tendencia ascendente ya que en 2021 aumentó su valor económico un 9% respecto a la media de las últimas 5 campañas (2016-2020) (MAPA, 2022). España es el primer productor de la UE de frutas y hortalizas (con más del 26% de la producción europea) y el séptimo a nivel mundial. En 2021 la producción de frutas y hortalizas alcanzó los 29 millones de toneladas, un 4% más que en 2020 y un 3% más que la media de las cinco anteriores. Cerca del 60% de la producción es de hortalizas, seguido de los cítricos (27%) y de la fruta dulce (11%) (MAPA, 2022). Además, cerca del 10 % del volumen total de la cesta de los hogares es de hortalizas. El consumo medio por persona y año llega a ser de 57,94 kilogramos (MAPA, 2021). De éste, casi el 50% del volumen es debido al consumo de hortalizas de fruto y flores, donde se incluyen tomates, pepinos, berenjenas, calabacines, pimientos, coles y brócoli. A este grupo le siguen las hortalizas tipo raíces, bulbos y tubérculos como cebollas, zanahorias y ajos (FAO, 2021).

### 3.2. Recolección, almacenamiento y comercialización del calabacín

La mayoría de los frutos inmaduros como el calabacín, se cosechan de forma manual. Un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de la recolección es que este tipo de hortalizas posee una piel muy delicada, la cual se puede dañar fácilmente durante la cosecha y el manejo o la postcosecha, por lo que todas las operaciones se tienen que llevar a cabo cuidadosamente con el fin de prevenir daños en el producto y cambios asociados con la pérdida de calidad visual o una mayor susceptibilidad a la deshidratación y al desarrollo de podredumbres.

Los cultivos de calabacín están listos para ser recolectados a los 60-80 días después de la siembra de la semilla. Los frutos se pueden recolectar 7 días después de la fructificación y se debería llevar a cabo la cosecha en intervalos de 2 a 3 días para conseguir un rendimiento adecuado (Cantwell y Kasmire, 2007).

Durante la etapa de enfriamiento es importante que se cumpla el rango de temperaturas apropiado para este tipo de producto, ya que si se aplican temperaturas más bajas durante un tiempo de exposición más o menos prolongado, es posible que se desarrolle lo que se denomina el daño por frío (DF), el cual es acumulativo y su severidad depende de la temperatura y del período de exposición (Cantwell y Kasmire, 2007).

El calabacín es un fruto que se cosecha en estado de inmadurez fisiológica, por tanto, son frutos que aún están en crecimiento, presentando por ello una alta actividad metabólica y una escasa protección por parte de la epidermis, lo que hace que su vida postcosecha sea corta. En concreto, a un intervalo de temperatura entre 5-10°C cuentan con una vida de almacenamiento de 1 a 2 semanas (Salunkhe, 2004). Suelen ser comestibles en cualquier momento durante su recolección antes de que la piel empiece a endurecerse y las semillas lleguen a su tamaño máximo. En Europa se recolectan cuando aproximadamente se han alcanzado los 3/4 de la madurez completa y presenta unos 15-20 cm de longitud y unos 5 cm de diámetro. En este momento, cuando la piel es tierna y las semillas aún no han madurado completamente, el rendimiento es mayor.

### 3.3. Definición e importancia de la alteración fisiológica “daños por frío” (DF)

El daño por frío es una alteración fisiológica que se produce cuando se exponen los tejidos vegetales a una temperatura dada, por debajo de su temperatura de almacenamiento recomendada, que será diferente en función del tipo de producto. Este umbral varía dependiendo de la especie y de la variedad (Siddiq, 2012). Este proceso de alteración desata una

cascada de reacciones bioquímicas que derivan en el desarrollo de diferentes síntomas. Estos síntomas se manifiestan en gran medida después de que el producto sensible se vuelve a colocar a una temperatura más elevada, como la temperatura ambiente. Se produce una alteración celular cuyos efectos se aceleran con el aumento de la temperatura (Tirilly y Bourgeois, 2002).

El DF ha sido una problemática tratada por numerosos científicos que atestiguan la importancia de esta enfermedad fisiológica (Zhang *et al.*, 2021). Esta alteración afecta a varias especies de importancia comercial y su desarrollo es muy frecuente al mismo tiempo que desconocido. Por este motivo, es importante establecer los umbrales de sensibilidad (temperatura) y de tolerancia (tiempo de exposición) de los productos para prevenir la enfermedad al igual que conocer los síntomas distintivos del DF en cada especie y diseñar distintas estrategias que permitan inhibir su desarrollo.

### 3.3.1. Síntomas generales y específicos de daño por frío en el caso del calabacín

Entre los síntomas más frecuentes de la enfermedad encontramos: depresiones en la superficie, pequeñas («pitting») o más extendidas, oscuras y acuosas; zonas con desarrollo de podredumbres; pérdida de agua y deshidratación; necrosis en forma de pequeñas lesiones negras; cambios del color (pérdida de clorofila, maduración anormal, manchas sombrías en la superficie); pardeamiento interno (en los haces vasculares y en las semillas) y en la producción de etileno; degradación del tejido interno debido a fugas de metabolitos que a su vez favorecen el crecimiento de microorganismos; alteración del sabor y del aroma; senescencia acelerada (Lukatkin, 2012 y Tirilly y Bourgeois, 2002).

Las picaduras o depresiones en la piel son el síntoma de lesión por frío más común. Ocurre debido a la ruptura de las células debajo de la superficie de la piel. Estas depresiones a menudo son negras y están relacionadas con una pérdida excesiva de agua que incrementa su severidad (Rai, Kumari y Vashistha, 2022).

Las hortalizas de la familia de las Cucurbitáceas, donde se incluye al calabacín, son sensibles a temperaturas inferiores a 10°C. Los síntomas suelen aparecer después de 5-10 días de exposición a temperaturas inferiores a 5°C, aunque el tiempo máximo de exposición dependerá del cultivar. Se produce una alteración del color y ablandamiento de diferentes zonas del fruto por deshidratación. Además, las lesiones superficiales pueden favorecer el desarrollo de podredumbres, ocasionadas principalmente por *Alternaria* (Tirilly y Bourgeois, 2002).



### 3.4. Mecanismo bioquímico de la alteración

El mecanismo bioquímico que conduce al desarrollo de los síntomas de esta enfermedad todavía no está totalmente aclarado a pesar de los numerosos estudios llevados a cabo hasta el momento (Martínez, 2021) y la importancia económica que supone la pérdida de calidad asociada a esta alteración. Durante la etapa de senescencia y el comienzo de este deterioro fisiológico, los procesos catabólicos o degradativos predominan sobre los anabólicos o biosintéticos. Además, en general, durante esta fase se produce una disminución de los procesos metabólicos y de la síntesis de proteínas y ARN. De forma paralela, la tasa respiratoria experimenta un lento y gradual descenso y se produce un aumento del contenido en aminoácidos libres y de las formas nitrogenadas solubles. Por último, se produce un incremento de la concentración de diversos radicales libres y de las reacciones que estos originan asociadas al deterioro de muchos componentes. Al conjunto de estas últimas reacciones se denomina estrés oxidativo (Martínez, 2021). Durante esta etapa, se activan diversos procesos que, entre otras cosas, determinan la modificación de la estructura lipídica y la inactivación de muchos enzimas, asociados ambos procesos a la sintomatología observada durante los daños por frío.

Todos estos procesos conducen a diferentes alteraciones que evolucionan hasta la muerte del fruto y cese total de la actividad metabólica, destacando, el marchitamiento de los tejidos por pérdida excesiva de agua, la pérdida de sabor, aroma o color, calidad nutritiva y calidad microbiológica (Martínez, 2021).

Paralelamente a estos cambios bioquímicos, se producen numerosos cambios en las propiedades físicas de las estructuras de membrana teniendo como consecuencia un aumento en la permeabilidad de las mismas, relacionado con un aumento en la salida de diferentes tipos de metabolitos. Estos cambios están asociados a una modificación de la estructura de membrana, pasando de tener una estructura cristalina a una estructura líquida flexible (cambio de viscosidad de la fase lipídica de las membranas celulares); que se acompaña además de una disminución de los ácidos grasos insaturados, lo que ocasionalmente daña la función de la membrana además de provocar una acumulación de malondialdehído (MDA) (Wang, 1994). Como consecuencia, se genera una mayor salida de solutos (iones y moléculas pequeñas) de las células. Esta es la principal consecuencia atribuida a este tipo de patología y la mayoría de los autores están de acuerdo en que las membranas celulares son los blancos principales del daño por frío.

El principal trastorno metabólico secundario causado por los daños de membrana es el suministro insuficiente de energía, un efecto potencialmente nocivo para las frutas y hortalizas

en postcosecha (Razavi *et al.*, 2018). La presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células vegetales es un estrés secundario que puede ser tanto de tipo biótico como abiótico. Estas especies reactivas, entre las que se encuentran los radicales libres, se van a encargar de peroxidar los lípidos de las membranas celulares dando lugar al estrés oxidativo (Tirilly y Bourgeois, 2002). La acumulación excesiva de ROS, incluidos el oxígeno singlete ( $O_2$ ), el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^\cdot$ ), podría dañar los ácidos nucleicos, las proteínas y los ácidos grasos en las células (Zhang *et al.*, 2021). Se ha demostrado que el DF en productos hortícolas está asociado a un importante incremento en la concentración de ROS, que a su vez conduce a otros trastornos metabólicos fisiológicos (Aghdam y Bodbodak, 2013).

### 3.5. Métodos y estrategias para la prevención y control de los daños por frío

La importancia de la prevención de los DF o la reducción de sus efectos es evidente. La aplicación de tecnologías postcosecha que permitan almacenar el fruto durante más tiempo a temperaturas de refrigeración, así como controlar el desarrollo de esta fisiopatía durante un almacenamiento o transporte prolongado será determinante para evitar las pérdidas asociadas a esta enfermedad (Rai, Kumari y Vashista, 2022).

#### 3.5.1. Tratamientos físicos

##### 3.5.1.1. Modulación de la temperatura de almacenamiento

###### - Acondicionamiento al frío

La sensibilidad al frío puede ser reducida mediante el mantenimiento previo de las hortalizas durante 2-3 días a una temperatura ligeramente superior a la temperatura crítica, antes de comenzar el almacenamiento en frío (Tirilly y Bourgeois, 2002).

Según Carvajal *et al.* (2015), el acondicionamiento del calabacín a 15°C durante 48 horas redujo los síntomas de daño por frío durante su posterior almacenamiento a 4°C, siendo significativas las diferencias encontradas con el lote control (sin acondicionamiento) a los 7 y a los 14 días. El efecto del tratamiento se vio reflejado en el contenido de celulosa, que resultó más elevado en los frutos preacondicionados y en la acumulación de lignina, asociada a una mayor integridad de la pared celular.

Otro estudio llevado a cabo por Chaudhary *et al.* (2014) concluyó que el acondicionamiento de pomelos a 16°C durante 7 días antes de su posterior almacenamiento a 2°C, redujo los DF. Este tratamiento ayudó a mantener el sabor y también la concentración de

compuestos bioactivos como flavonoides, furocumarinas, limonoides y vitaminas que a su vez actúan como un importante componente de las defensas naturales de las hortalizas contra el estrés.

Zhang *et al.* (2017) demostraron que el almacenamiento de mango a 12°C durante 24 horas seguido de una refrigeración a 5°C durante 25 días redujo la salida de electrolitos y los niveles de malondialdehído, manteniendo así la integridad de la membrana en mayor medida, respecto a los frutos control (sin acondicionamiento previo).

#### *- Calentamientos intermitentes (CI)*

Este tipo de tratamiento representa un enfoque físico efectivo para aliviar el DF y es utilizado en el proceso de almacenamiento de numerosas hortalizas. Consiste en someter al producto a ciclos de calentamiento durante un tiempo y temperatura determinados, aplicados de forma periódica durante la frigoconservación (Liu *et al.*, 2015).

Por ejemplo, 3 ciclos de calentamiento intermitente (CI) a 20°C durante 24 horas cada 7 días, redujeron el DF y la descomposición en tomates almacenados a 2,5°C durante 27 días (Biswas *et al.*, 2012). CI desde 2,5°C a 12,5°C durante 18 h aplicados cada 3 días frenaron el desarrollo de los síntomas de DF en pepino (Cabrera y Saltveit, 1990). Además, CI a 20°C durante 24 h a intervalos de 3 días aliviaron los síntomas de DF y aumentaron la firmeza del pimiento, debido al retraso de la disminución del contenido de ácidos grasos insaturados (Liu *et al.*, 2015).

#### *- Acondicionamiento por calor*

La tolerancia al frío de las hortalizas puede ser controlada además mediante tratamientos con calor moderado. La temperatura y el tiempo de tratamiento depende del tipo y variedad de producto, aunque se recomienda usar altas temperaturas durante períodos cortos de tiempo ya que afectarían en menor medida a las características organolépticas del producto (Zhang, 2021).

Lafuente *et al.* (1991) comprobaron que los pepinos toleran mejor el almacenamiento a 5°C si previamente han sido expuestos a un rango de temperatura de entre 36°C a 40°C durante 24 horas. McDonald *et al.* (1996) obtuvieron resultados similares en tomate mediante un pretratamiento a 42°C durante una hora o a 38°C durante dos días, lo que prolongó su vida útil en conservación y permitió mantener un perfil aromático y calidad sensorial adecuados durante más tiempo.

El efecto de este tipo de tratamientos está basado en la respuesta general de las plantas al estrés. En la mayoría de los estreses están implicados varios mecanismos de defensa, entre los que se encuentra la estimulación de la biosíntesis de los compuestos fenólicos o la inducción de las proteínas de choque térmico. La exposición de los tejidos a un estrés (como puede ser la temperatura moderada durante un tiempo corto) puede, por tanto, inducir la resistencia a otro tipo de estrés (temperatura de daño por frío) al permitir la estimulación de mecanismos de defensa de la planta (Tirilly y Bourgeois, 2002).

#### 3.5.1.2. Alta humedad relativa

Se ha comprobado que el mantenimiento de una elevada humedad relativa (próxima a la saturación) rodeando al producto permite disminuir o prevenir el desarrollo de los síntomas de DF en varias hortalizas (Tirilly y Bourgeois, 2002). Un estudio reciente llevado a cabo por Zuo *et al.* (2022) demostró que el almacenamiento de calabacines en cámara frigorífica de alta HR (4°C, HR: 98 ± 2 %) controlada por un sistema de "niebla seca" durante 15 días permitió inhibir en gran medida el desarrollo de los síntomas asociados al daño por frío. Este tratamiento además de inhibir el daño por frío, disminuyó el aumento de las actividades de hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa en comparación con el control, lo que indica una disminución de la respiración anaeróbica. Además, el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa fue superior.

Otros estudios han demostrado que el déficit hídrico puede provocar la aparición de trastornos fisiológicos y deterioro de la calidad de diferentes variedades de frutos como en el caso del pepino. Fahmy y Nakano (2013), optaron por un almacenamiento en alta humedad relativa (96%) a 5°C para restringir el déficit de agua, retrasar el deterioro de la calidad y además, reducir los DF. Estos autores comprobaron un descenso en la salida de electrolitos y el contenido en malondialdehído (indicadores de un menor daño de membrana) con respecto a los pepinos almacenados a baja humedad relativa (60%). El contenido de MDA refleja la peroxidación lipídica causada por el estrés a los DF, se trata de un producto secundario de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados del tejido de los frutos, por lo que tiene un papel muy importante como indicador de DF (Lukatkin, 2002).

#### 3.5.2. Tratamientos químicos

##### 3.5.2.1. Recubrimientos comestibles

El uso de recubrimientos comestibles ha surgido como respuesta a la demanda cada vez mayor de métodos de origen natural para el mantenimiento de la calidad de las frutas y

hortalizas. Pueden estar formados por proteínas, lípidos o polisacáridos y sus combinaciones con otros metabolitos como aceites esenciales o compuestos fenólicos son frecuentes (Castro-Cegri *et al.*, 2023). Los polisacáridos son los compuestos más empleados, siendo los más habituales el almidón, el quitosano, la celulosa, la pectina y sus derivados, como el pululano, la carboximetilcelulosa o los alginatos (Duong *et al.*, 2022; Etemadipoor *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2018; Shiekh, Ngiwngam y Tongdeesoonorn, 2021). En general, actúan como una barrera selectiva frente a los gases y la deshidratación, preservando la calidad del producto durante su almacenamiento (Baldwin, Nisperos-Carriedo y Baker, 1995; Thakur *et al.*, 2019).

En algunas frutas y hortalizas se ha comprobado además su eficacia como método de control frente a esta alternación. Por ejemplo, Castro-Cegri *et al.* (2023) aplicaron un recubrimiento compuesto por dextrina en calabacines. Los resultados obtenidos demostraron que este tipo de recubrimiento disminuyó el DF tras 14 días de almacenamiento a baja temperatura, además de reducir la peroxidación lipídica y mantener la firmeza de los frutos.

#### 3.5.2.2. Óxido nítrico (NO) y melatonina

El óxido nítrico es una sustancia con un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Numerosos estudios en los últimos años han demostrado que el NO se puede utilizar para mejorar la calidad comercial de los productos hortícolas postcosecha (Jiménez-Muñoz *et al.*, 2021; Zhang, Cao, Fan, & Jiang, 2020). Por otro lado, la melatonina es una hormona relativamente reciente descrita en vegetales, aunque en animales es bien conocida. Se trata de una candidata prometedora en la mejora de la calidad de los productos hortícolas postcosecha (Gao *et al.*, 2018; Jannatizadeh, 2019). Un estudio reciente ha revelado que existe una sinergia bioquímica entre la melatonina y el NO en el mantenimiento de la calidad de las frutas y hortalizas (Zhang *et al.*, 2020). La melatonina funciona como regulador endógeno del crecimiento de las plantas, desempeña múltiples funciones en la senescencia de las hojas, la fotoprotección, la integridad de la membrana, el desarrollo de las raíces, la osmorregulación y la protección contra el estrés biótico y abiótico (Rastegar, Hassanzadeh Khankahdani y Rahimzadeh, 2020). Normalmente, este tipo de tratamientos se llevan a cabo mediante la inmersión de los productos en diferentes concentraciones de melatonina. Además de aplicar tratamientos con melatonina para mantener la calidad comercial, en los últimos años se ha empleado como técnica para inhibir el desarrollo de los DF. Por ejemplo, Gao *et al.* (2016) demostraron que los tratamientos con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de melatonina durante 10 minutos en melocotones permiten retrasar la senescencia y aumentar su tolerancia al frío a través de la activación del sistema antioxidante. Otro tratamiento llevado a cabo por Kebbeh *et*

al. (2023) se basó en la inmersión de frutos de mango en dos concentraciones diferentes de melatonina 0,1 y 0,2 mmol/L durante 30 minutos y su posterior secado al aire a temperatura ambiente y almacenamiento a 5°C. Los resultados obtenidos reflejaron un descenso de la tasa respiratoria además del mantenimiento de la estabilidad celular de las membranas mediante el análisis de la permeabilidad celular a través de la fuga de electrolitos, lo que contribuyó posteriormente a mejorar la tolerancia al frío de la fruta de mango.

#### **4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La mayor parte de la producción española de calabacín se exporta a países lejanos y es necesario que el producto llegue a su destino en óptimas condiciones de calidad. Por lo tanto, la conservación de los frutos y la duración de su vida útil es un factor de especial importancia en la comercialización. El calabacín es un fruto de origen subtropical, y a pesar de que, en un principio, el almacenamiento en frío puede atenuar y ralentizar los efectos de la senescencia, la exposición prolongada a temperaturas subóptimas puede hacer que se manifiesten un conjunto de síntomas que hacen que los frutos pierdan su valor comercial y que son asociados al desorden denominado daños por frío.

Aunque esta fisiopatía ha sido estudiada durante muchos años, los mecanismos implicados no están todavía suficientemente esclarecidos y resulta necesario, tanto el estudio de diferentes estrategias que aumenten la tolerancia al daño, como la investigación de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en las diferentes fases del proceso. En la actualidad, coexisten 2 hipótesis sobre la bioquímica implicada, la primera de ellas relacionada con cambios estructurales de la membrana celular y la segunda basada en la puesta en marcha de los diferentes tipos de mecanismos de defensa antioxidante que tienen las plantas y que son iniciados como respuesta a diferentes situaciones de estrés.

El objetivo general de este TFG ha sido evaluar la aptitud de diferentes estrategias postcosecha para el control del desarrollo de los daños por frío en calabacín. Para ello, durante un estudio de vida útil, se ha analizado el efecto de cada una de las tecnologías aplicadas en diferentes parámetros de calidad, fisiológicos o bioquímicos que nos han permitido analizar su mecanismo y relacionarlo con su menor o mayor eficacia.

Para la consecución de este objetivo global, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a) Cuantificar los efectos de las diferentes estrategias de control (calentamiento intermitente, tratamiento con melatonina y almacenamiento en elevada HR) sobre la incidencia y severidad del daño por frío, así como sobre la calidad comercial del fruto.
- b) Evaluar la influencia de cada uno de los tratamientos ensayados sobre los parámetros asociados al mantenimiento de la integridad de la membrana, uno de los mecanismos implicados en la aparición del daño por frío.
- c) Analizar el estrés oxidativo y los mecanismos antioxidantes de defensa del calabacín cuando es almacenado a temperatura de inducción de daño por frío, cuantificando el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, así como su actividad antioxidante total.
- d) Identificar cuál de los diferentes tipos de mecanismos implicados tiene mayor influencia en el desarrollo del daño mediante el cálculo de diferentes correlaciones entre el índice de DF observado y los diferentes parámetros analizados.
- e) Proponer la estrategia más eficaz para el control del daño por frío en calabacín durante un periodo de almacenamiento prolongado.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material vegetal y desarrollo experimental

Para la realización de este trabajo se utilizaron 125 calabacines (*Cucurbita pepo*) del mismo calibre (21-30 cm), variedad “Sinatra” y categoría I con origen Almería. Los frutos fueron recolectados el día previo al comienzo del estudio y transportados en refrigeración a las instalaciones de Mercazaragoza, desde donde fueron transportados al laboratorio del Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal (Facultad de Veterinaria de Zaragoza).

Tras una primera etapa de clasificación en la que se descartaron aquellos frutos dañados exteriormente, los calabacines se dividieron en 5 lotes homogéneos de 20 calabacines cada uno a los que se les aplicaron los diferentes tratamientos de control de DF. Uno de los lotes no recibió ningún tipo de tratamiento, constituyendo así el lote CONTROL. Los tratamientos aplicados fueron: calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días), tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000 µM) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%).

Una vez aplicados los diferentes tratamientos, todos los lotes (incluido el lote control), fueron almacenados durante 28 días a 3°C (definida como temperatura de DF). De forma periódica (a los 0, 7, 14, 21 y 28 días + 24h/21 °C), se llevó a cabo el análisis de diferentes

parámetros relacionados tanto con la calidad comercial como con las reacciones bioquímicas implicadas en el desarrollo de los daños por frío. Los parámetros analizados fueron: el cálculo de la incidencia y la severidad del daño por frío (según la escala y fórmulas incluidas en el apartado 5.3.), la pérdida de peso (%), la actividad respiratoria (mL O<sub>2</sub>/kg h y mL CO<sub>2</sub>/kg h), la firmeza (g), el color (coordenadas CIE L\*a\*b\*), los sólidos solubles (°Brix), la salida de electrolitos (%), la muerte celular (%), el contenido en malondialdehído (MDA) (nmol MDA/g), la concentración de compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/100 g peso fresco) y el contenido total de flavonoides (mg catequina/100 g peso fresco), así como la capacidad antioxidante total (μmol Trolox/100 g peso fresco).

En el Anexo I se incluye el desarrollo experimental planteado para el presente Trabajo de Fin de Grado.

## 5.2. Aplicación de los tratamientos para el control de los daños por frío

### 5.2.1. Ciclos de calentamiento intermitente (CI)

Durante los 28 días de conservación, se aplicaron 4 ciclos de calentamiento intermitente, en el que los frutos tras 7, 14, 21 y 28 días, fueron trasladados de 3°C a 21°C durante 24 horas y posteriormente devueltos a refrigeración.

### 5.2.2. Tratamiento con melatonina (100 μM y 1000 μM)

Este tratamiento fue aplicado mediante inmersión de los calabacines en dos soluciones con diferente concentración de melatonina, (100 y 1000 μM) durante 15 minutos. La aplicación se llevó a cabo el día inicial del estudio de vida útil a temperatura ambiente. Posteriormente, los calabacines fueron secados a temperatura ambiente durante 1 hora y llevados a la cámara frigorífica junto con el resto de lotes.

### 5.2.3. Almacenamiento en alta humedad relativa (HR)

En este caso, los frutos fueron almacenados durante los 28 días de estudio en condiciones de elevada HR utilizando para ello una bolsa con permeabilidad selectiva al vapor de agua. Durante todo el estudio, la HR fue registrada con un medidor de humedad Testo 184 H1, comprobándose un % HR del 97-98 ± 1,5%.

## 5.3. Evaluación de la incidencia y severidad de los daños por frío

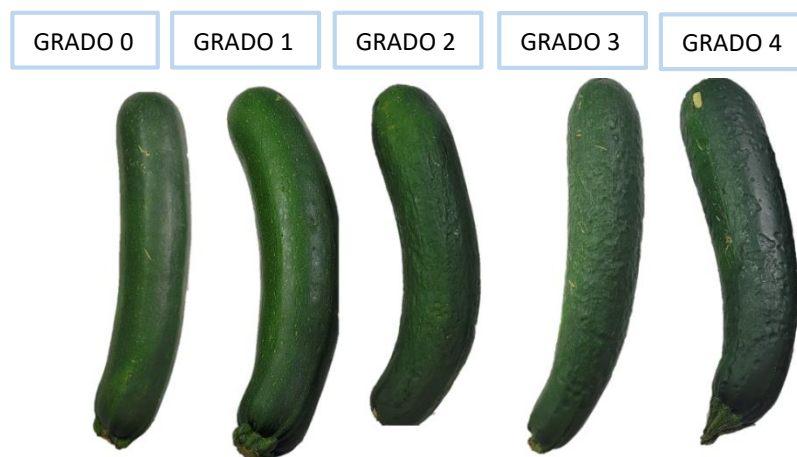
El análisis de la incidencia y severidad de los daños por frío fue llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito en Wang *et al.* (1996), en el que se evaluó tanto la superficie del fruto afectado como la severidad del daño desarrollado. Se empleó una escala dividida en 5 grados



en función de la extensión de los daños (pitting) sobre la superficie del calabacín y su severidad. Para evaluar la extensión de los daños, los grados elegidos fueron: grado 0 sin daño por frío; grado 1 con daño por frío o superficie lesionada inferior al 5%; grado 2 con superficie de daño por frío entre 5% y 25%; grado 3 con zona dañada por frío entre el 26% y 50% y grado 4 cuando la superficie de lesión es superior al 50%. El índice de daños por frío se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$DF = \frac{\sum (\text{grado en escala DF } (0 - 4)) \times \text{n}^\circ \text{ frutos dentro de cada grado}}{\text{n}^\circ \text{ total de frutos}}$$

En cuanto a la severidad, ésta fue evaluada también de manera visual mediante la escala indicada en la figura 1 en la que el grado 0 corresponde a lesiones muy leves; grado 1, lesión leve; grado 2, moderada; grado 3, daños graves y grado 4, muy graves. Esta determinación nos permitió establecer, para cada uno de los lotes y en cada día de análisis, el porcentaje de frutos en cada grado de severidad.



**Figura 1.** Escala de severidad de daños por frío en calabacín

#### 5.4. Parámetros físico-químicos y fisiológicos

##### 5.4.1. Pérdida de peso

La pérdida de peso (%) fue calculada sobre 20 calabacines de cada lote registrando de forma individual su peso en distintos días de almacenamiento, según la siguiente fórmula (Zuo *et al.*, 2021):

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

##### 5.4.2. Firmeza

La firmeza se determinó mediante un ensayo destructivo de penetración o Magness-Taylor, el cual se define como la fuerza necesaria para introducir en la zona ecuatorial del fruto

un vástago cilíndrico. Las medidas instrumentales de textura se llevaron a cabo en un texturómetro TA-XT PLUS (Stable Micro Systems, Goaldming, Inglaterra) dotado con una célula de carga de 5 Kg, con el que se realizaron los ensayos de penetración sobre la parte ecuatorial del calabacín. En este ensayo se utilizó un vástago de 2 mm de diámetro, introduciéndolo hasta una profundidad de 10 mm a una velocidad de 0,005 m/s. En cada día de análisis, la medida se realizó sobre 5 muestras por lote. La firmeza es definida como el esfuerzo máximo de penetración que se corresponde con el valor máximo sobre el eje Y, expresado por unidad de fuerza (g).

#### 5.4.3. Medida instrumental del color

La medida instrumental del color se realizó con un colorímetro CROMA METER CR-400 (Konika Minolta, Japan). La determinación se realizó durante 3 segundos en 3 puntos diferentes de la superficie del calabacín. Las medidas de reflexión se realizaron cada 1 nm en el espectro visible y en el infrarrojo, con un intervalo de medida de 360 nm a 900 nm. A partir de estas medidas se obtienen las coordenadas CIELAB,  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , que forman parte de los parámetros CIE (Comisión Internationale del Éclairage). En este espacio de color,  $L^*$  indica claridad y  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas de cromaticidad, que indican direcciones de colores:  $+a^*$  es la dirección del rojo,  $-a^*$  es la dirección del verde,  $+b^*$  es la dirección del amarillo y  $-b^*$  es la dirección del azul, siendo el centro acromático. Además, el tono o matiz ( $h^*$ ) es el atributo según el cual el estímulo parece ser similar a uno de los colores percibidos: rojo ( $45^\circ$ ), amarillo ( $90^\circ$ ), verde ( $135^\circ$ ) o azul ( $270^\circ$ ) o a ciertas proporciones de ellas y que se define como la arco tangente de  $a^*/b^*$ . Se utilizaron para estos cálculos el iluminante D65. Si consideramos las coordenadas rectangulares  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  la diferencia entre dos colores viene dada por la fórmula:

$$\Delta E^{*a,b} = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

Esta diferencia se mide en unidades CIELAB, y se considera, en términos generales, que el ojo es capaz de discriminar entre dos colores contiguos cuya diferencia de color sea de una unidad. Si los colores están separados, la discriminación de colores es mucho peor, pudiendo elevarse la diferencia de color hasta las cinco unidades o más. En cada día de análisis, la medida se realizó sobre 5 muestras por lote.

#### 5.4.4. Sólidos solubles

Para la determinación del contenido en sólidos solubles totales (SST) se siguió la técnica descrita en los Métodos Oficiales de Análisis de Zumos de Frutas (AOAC, 1984). La medida se realizó utilizando 2 gotas de 3 zumos obtenidos a partir de 5 frutos de cada tratamiento,

analizándose en un refractómetro digital (Ilg-labware, Alemania) con corrector automático de temperatura. Los resultados se expresaron en °Brix a 20 °C.

#### 5.4.5. Actividad respiratoria

Para la determinación de la actividad respiratoria se empleó el sistema cerrado. Para ello se colocaron los frutos, aproximadamente 400 g, en el interior de recipientes herméticos de 3 L y se determinó la concentración de los gases en el espacio de cabeza después de 4 horas a 20 °C. Se tomaron alícuotas de gas a través de un septum y las muestras se analizaron utilizando un analizador automático de gases PBI (Dansensor; Barcelona, España) que nos permite obtener una medida inmediata del porcentaje de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> existente en el interior de los frascos de medida. En cada día de análisis, se realizaron 3 réplicas por cada lote expresándose los resultados en mL O<sub>2</sub>/kgh (consumo de O<sub>2</sub>) y mL CO<sub>2</sub>/kgh (producción de CO<sub>2</sub>).

### 5.5. Parámetros implicados en el metabolismo de los daños por frío

#### 5.5.1. Parámetros asociados a daños estructurales en la membrana celular

##### 5.5.1.1. Salida de electrolitos

Este análisis se realizó según el método propuesto por Mao *et al.* (2007). Para ello, se obtuvieron discos de piel de 11 milímetros de diámetro de diferentes zonas del calabacín. Estos discos fueron enjuagados tres veces con agua destilada. Posteriormente, se colocaron en 50 ml de agua destilada y se llevaron a agitación durante 30 minutos, tras lo que se midió con un conductímetro (Conductimeter GLP32, Crison, Barcelona), la conductividad (C<sub>0</sub>). Tras la ebullición de los discos durante 10 minutos y su posterior enfriamiento a temperatura ambiente, se repitió la medida de la conductividad (C<sub>1</sub>). El análisis fue realizado por triplicado para cada uno de los tratamientos en cada día de análisis.

La salida de electrolitos (%) se determinó siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ salida de electrolitos} = \left( \frac{C_0}{C_1} \right) \times 100$$

##### 5.5.1.2. Tasa de muerte celular

La muerte celular fue analizada según el método descrito en Qu *et al.* (2009). La determinación consiste en un análisis espectrofotométrico basado en la absorción del compuesto Trypan Blue por parte de la piel de los calabacines. Para la realización de este ensayo, se obtuvieron 8 discos de piel de diferentes calabacines utilizando para ello un sacabocados de 7 milímetros de diámetro. Los discos de piel se sumergieron en 5mL de Trypan Blue al 0,25% y fueron agitados en una plataforma vibratoria durante 15 minutos. Posteriormente, se

enjuagaron con agua destilada hasta la desaparición del color azul y se secaron sobre papel de filtro. Las piezas fueron pesadas y posteriormente homogeneizadas con agua destilada en ultraturrax (Yellowline DI 25 basic, Schott, Barcelona) teniendo en cuenta la proporción 0,3 g de piel /3 ml agua destilada. Para finalizar, se centrifugó la mezcla a 4000 x g durante 10 min a 4°C (Centrífuga Heraeus MEGAFUGE 1.0R, Alemania) obteniéndose un sobrenadante sobre el que se midió su absorbancia a 585 nm (Jenway 7205, Stone, Reino Unido) a una longitud de onda de 585 nm. El valor de absorbancia es proporcional a la tasa de muerte celular. El análisis fue realizado por triplicado para cada uno de los tratamientos en cada día de análisis.

#### 5.5.1.3. Contenido en malondialdehído (MDA)

El contenido en malondialdehído fue determinado siguiendo el método propuesto por Wang *et al.* (2013) con ligeras modificaciones. En primer lugar, se llevó a cabo la homogeneización en ultraturrax (Yellowline DI 25 basic, Schott, Barcelona) de 2 gramos de piel del calabacín en 8 mL de tampón fosfato 50 mM (pH 7,8) (pH-meter BASIC 20+, Crison, Barcelona). Este homogeneizado fue centrifugado a 4000 x g durante 20 min a 4°C (Centrífuga Heraeus MEGAFUGE 1.0R, Alemania). A 1 ml del sobrenadante obtenido se añadieron 3 ml de una disolución de 5g/L TBA en 100 g/L de TCA. La solución fue llevada a ebullición durante 10 min y posteriormente, rápidamente enfriada para detener la reacción. Por último, una vez enfriada, se centrifugó a 4000 x g durante 10 min a 4°C. La medida de la absorbancia del sobrenadante obtenido a 532, 600 y 450 nm nos permitió calcular la concentración de MDA aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido en MDA (nmol/g)} = [6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}] \times \frac{V_t \times V_r}{V_s \times m}$$

Donde los valores de  $A_{532}$ ,  $A_{600}$  Y  $A_{450}$  son las absorbancias medidas a esas longitudes de onda,  $V_t$  es el volumen en L de la solución de extracción,  $V_r$  es el volumen en L de la solución de reacción,  $V_s$  es el volumen en L del sobrenadante tomado de la solución de extracción y  $m$  es la masa de muestra utilizada en kg. El análisis fue realizado por triplicado para cada uno de los tratamientos en cada día de análisis.

#### 5.6.2. Parámetros asociados al estrés oxidativo

##### 5.6.2.1. Determinación de los compuestos fenólicos totales

La determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales se realizó según el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965) y posteriormente modificado por Singleton, Orthofer y Lamuela-Raventos (1999). Se homogeneizaron 5 g de piel de 5 calabacines/lote con 10 ml de etanol:agua 80:20 (v:v) en ultraturrax (Yellowline DI 25 basic,

Schott, Barcelona). Posteriormente, este homogeneizado fue centrifugado (Centrífuga Heraeus MEGAFUGE 1.0R, Alemania) a 4000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado mediante filtros de 0,45 µm (Chromafil Xtra PA, Alemania) constituyendo así el extracto fenólico.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos, se tomaron 5 ml del extracto a los que se añadió 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu agitándose durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 0,5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5% y 7 ml de agua destilada. La mezcla obtenida se incubó durante 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, tras lo cual, se procedió a la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm (Jenway 7205, Stone, Reino Unido). Los resultados obtenidos se extrapolaron a una curva de calibrado elaborada a partir de diferentes concentraciones de ácido gálico (0-100 mg/L), las cuales fueron sometidas al mismo tratamiento que la muestra. Los resultados obtenidos se expresaron en mg de ácido gálico/100 g de peso de la muestra. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### 5.6.2.2. Determinación del contenido total de flavonoides

Para evaluar el contenido de flavonoides totales se siguió el método propuesto por Iacopini *et al.* (2010). El extracto utilizado es el mismo que el empleado para el análisis de los compuestos fenólicos totales. Se utilizaron 0,5 ml del extracto al que se le añadieron 0,1 ml de NaNO<sub>2</sub> al 5% agitándose posteriormente durante 5 minutos. Tras este tiempo, se adicionó 0,1 ml de AlCl<sub>3</sub> al 10% y de nuevo se agitó y se esperó durante un minuto. Para finalizar, se añadieron 0,6 ml de NaOH al 10%. Por último, se llevó a cabo la medida de la absorbancia a 510 nm. Para poder extrapolar los resultados de la concentración de compuestos presentes en la muestra se realizó una recta de calibrado empleando catequina (0-200 mg/l) como patrón por considerarse el flavonoide mayoritario en las frutas. Cada una de las concentraciones sufrió el mismo tratamiento que la muestra. Los resultados obtenidos se expresaron en mg de catequina /100 g de peso fresco de la muestra, realizándose por triplicado para todos los lotes.

#### 5.6.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante total (método del radical libre DPPH)

El análisis de la capacidad antioxidante total se basó en los procedimientos de Llorach *et al.* (2008) y Tomás-Barberán, Ferreres y Gil (2000). En primer lugar, es necesario tener en cuenta que la solución DPPH tiene un color morado que va cambiando a amarillo conforme reacciona con los compuestos con capacidad antioxidante presentes en la muestra. Esta reacción colorimétrica es la que permite cuantificarlos.

Para este ensayo también fue utilizado el mismo extracto que el empleado para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales. 900 µL de extracto se

pusieron en contacto con 900 µL de solución DPPH previamente preparada. Después, se incubó la mezcla dos horas y media en oscuridad a temperatura ambiente y al finalizar el tiempo de incubación, se leyó la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro (Jenway 7205, Stone, Reino Unido). Para extrapolar los resultados de la muestra se elaboró una recta de calibrado a partir de una solución patrón de Trolox cuyas concentraciones sufrieron el mismo tratamiento que las muestras. Los resultados obtenidos fueron expresados en µmol de Trolox /100 g de peso fresco de la muestra. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

### 5.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software Pad Prism 8.4.2. (GraphPad, Boston, EE. UU.). Las diferencias en los valores medios se analizaron con un ANOVA (Análisis de varianza) de una vía y se separaron mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Parámetros de calidad del fruto

Uno de los aspectos de calidad más importantes en las hortalizas es su aspecto turgente, estrechamente relacionado con una mayor o menos deshidratación del producto. Durante todo el estudio de vida útil se monitorizó la pérdida de peso de 20 calabacines por lote. En la tabla 1 se muestran los porcentajes de pérdida de peso en cada lote evaluados cada 7 días. Se puede observar como en todos los lotes se produce un aumento de la pérdida de peso durante el almacenamiento, sin detectarse diferencias significativas entre los lotes, salvo en el caso de los frutos almacenados en condiciones de elevada HR, que no experimentó pérdidas superiores al 3% durante toda la conservación. Esta menor pérdida de peso estuvo relacionada con un mejor mantenimiento de la firmeza inicial durante más tiempo. La conservación en alta HR permitió frenar el ablandamiento de los frutos durante, al menos, 21 días de almacenamiento, observándose diferencias significativas respecto a los calabacines control ( $863,8 \pm 271,25$  g vs.  $1218 \pm 170,90$  g en el lote control y el lote HR, respectivamente).

**Tabla 1.** Efecto del tipo de tratamiento (calentamiento intermitente (CI) ( $21^{\circ}\text{C}/24\text{h}$  cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000 µM) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en la pérdida de peso (%) y firmeza (g) de calabacines conservados a  $3^{\circ}\text{C}/28$  días +  $1\text{día}/21^{\circ}\text{C}$ . Cada valor es la medida de 3 réplicas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey.

Días de almacenamiento a $3^{\circ}\text{C} + 1\text{día}/21^{\circ}\text{C}$	Tratamiento	Pérdida de peso (%)	Firmeza (g)
0	Control	-	$(1420 \pm 207,07)^a$
	CI	-	$(1420 \pm 207,07)^a$

	100 $\mu$ M	-	(1420 $\pm$ 207,07) <sup>a</sup>
	1000 $\mu$ M	-	(1420 $\pm$ 207,07) <sup>a</sup>
	HR	-	(1420 $\pm$ 207,07) <sup>a</sup>
7	Control	(3,98 $\pm$ 1,16) <sup>a</sup>	(1005 $\pm$ 292,74) <sup>a</sup>
	Cl	(4,59 $\pm$ 1,50) <sup>a</sup>	(1370 $\pm$ 149,70) <sup>bc</sup>
	100 $\mu$ M	(4,22 $\pm$ 1,43) <sup>a</sup>	(1124 $\pm$ 218,59) <sup>a</sup>
	1000 $\mu$ M	(3,71 $\pm$ 1,36) <sup>a</sup>	(1194 $\pm$ 101,43) <sup>ac</sup>
	HR	(0,67 $\pm$ 1,00) <sup>b</sup>	(1535 $\pm$ 84,77) <sup>b</sup>
14	Control	(7,35 $\pm$ 2,43) <sup>a</sup>	(978,4 $\pm$ 202,92) <sup>b</sup>
	Cl	(8,67 $\pm$ 2,98) <sup>a</sup>	(1221 $\pm$ 110,46) <sup>a</sup>
	100 $\mu$ M	(8,08 $\pm$ 2,49) <sup>a</sup>	(1231 $\pm$ 166,05) <sup>a</sup>
	1000 $\mu$ M	(6,96 $\pm$ 2,62) <sup>a</sup>	(1012 $\pm$ 120,62) <sup>b</sup>
	HR	(0,93 $\pm$ 0,90) <sup>b</sup>	(1259 $\pm$ 224,12) <sup>a</sup>
21	Control	(11,73 $\pm$ 4,02) <sup>a</sup>	(863,8 $\pm$ 271,25) <sup>a</sup>
	Cl	(14,19 $\pm$ 3,51) <sup>a</sup>	(828,3 $\pm$ 230,66) <sup>a</sup>
	100 $\mu$ M	(12,77 $\pm$ 4,28) <sup>a</sup>	(1009 $\pm$ 241,61) <sup>ac</sup>
	1000 $\mu$ M	(11,59 $\pm$ 5,18) <sup>a</sup>	(1115 $\pm$ 222,37) <sup>bc</sup>
	HR	(1,44 $\pm$ 1,15) <sup>b</sup>	(1218 $\pm$ 170,90) <sup>bc</sup>
28	Control	(15,69 $\pm$ 6,78) <sup>a</sup>	(1046 $\pm$ 250,37) <sup>a</sup>
	Cl	(17,91 $\pm$ 4,95) <sup>a</sup>	(1097 $\pm$ 175,01) <sup>a</sup>
	100 $\mu$ M	(18,63 $\pm$ 5,78) <sup>a</sup>	(1203 $\pm$ 290,04) <sup>a</sup>
	1000 $\mu$ M	(16,13 $\pm$ 6,64) <sup>a</sup>	(973,8230,40 $\pm$ ) <sup>a</sup>
	HR	(2,67 $\pm$ 0,76) <sup>b</sup>	(1026 $\pm$ 362,41) <sup>a</sup>

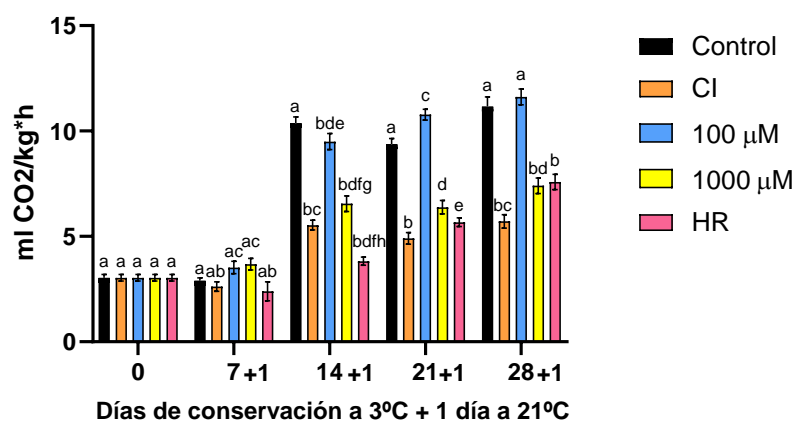
Han sido varios los autores que han observado una eficacia similar de diferentes tipos de tratamientos sobre el control de la deshidratación y su relación con un menor o mayor ablandamiento. Por ejemplo, Sogvar *et al.* (2020) aplicaron tratamientos con fenilalanina sobre ciruelas consiguiendo frenar la pérdida de peso durante 40 días de conservación. En su caso los frutos control experimentaron una pérdida del 6% mientras que las ciruelas tratadas con fenilalanina únicamente perdieron un 4%. En nuestro caso la eficacia del almacenamiento en alta HR fue todavía mayor (2,67  $\pm$  0,76 % vs. 15,69  $\pm$  6,78 % para calabacines en alta HR y calabacines control, respectivamente). Zuo *et al.* (2022) observaron resultados similares en calabacines almacenados durante 15 días en 97% HR.

Además de con la firmeza, esta mayor o menor pérdida de peso estará relacionada con la velocidad de respiración del producto. Un metabolismo respiratorio más acelerado dará lugar a una mayor velocidad de transpiración y por lo tanto, una mayor pérdida de peso. Han sido varios los autores que han comprobado efectos positivos de este tipo de tipo de tratamiento (elevada HR) sobre el mantenimiento de la firmeza en varios productos. Un ejemplo de ello, es el estudio realizado por Zuo, Cao, Jia *et al.* (2021) en el que además de analizar parámetros como la pérdida de peso, también se llevó a cabo el estudio de la firmeza. Para ello, los calabacines fueron almacenados a 4 $\pm$ 0,4°C con una HR del 96-100% durante 15 días. Observaron que la

firmeza del fruto disminuyó durante el almacenamiento en frío, pero gracias a la conservación en alta HR se consiguió evitar un ablandamiento excesivo. Al contrario que en nuestro caso, en el que no observamos ningún efecto significativo de los tratamientos con melatonina, otros autores sí que han comprobado su influencia. Un estudio llevado a cabo por Rastegar, Hassanzadeh Khankahdani y Rahimzadeh, (2020) concluyó que un tratamiento de melatonina (100  $\mu$ M) aplicado sobre mango durante 10 min consiguió mantener la firmeza del fruto de forma efectiva con respecto al lote control. Bhardwaj *et al.* (2022) aplicaron, también sobre mango, tratamientos de melatonina en 3 concentraciones diferentes (50, 100 y 150  $\mu$ M) durante 3 tiempos distintos (60, 90 y 120 min) observando un efecto positivo de la combinación de 100  $\mu$ M/120 min sobre el metabolismo respiratorio del producto. Se consiguió disminuir la producción de CO<sub>2</sub> durante los 28 días de almacenamiento del producto a  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ , lo que se tradujo en una mayor vida útil y calidad comercial. Hasta el momento, las investigaciones en las que se ha comprobado una eficacia de los tratamientos con melatonina sobre el control de los DF o mejora de la calidad del fruto, han sido llevados a cabo en productos diferentes al calabacín, como el pepino (Madebo *et al.*, 2021), el melocotón (Gao *et al.*, 2016), el mango (Rastegar, Hassanzadeh Khankahdani y Rahimzadeh, 2020; Bhardwaj *et al.*, 2022), o la granada (Jannatizadeh, 2019). Únicamente se ha encontrado un trabajo en el que el tratamiento de melatonina ha sido aplicado sobre calabacín y los resultados mostrados por estos autores (Medina-Santamarina *et al.*, 2022) son similares a los encontrados en nuestra investigación. En este trabajo se llevó a cabo el tratamiento con melatonina a diferentes concentraciones (0, 0,1, 0,5 y 1 mM) en distintos tiempos (10, 30, 60 y 180 horas), sin observarse ninguna eficacia en ninguna de las condiciones ensayadas.

Desde hace años se viene estudiando el efecto de los DF en los procesos fisiológicos de las plantas sensibles a este tipo de desorden. Algunos autores han observado un descenso de la actividad respiratoria que lo atribuyen a la destrucción de la estructura de las mitocondrias. Otros, sin embargo, concluyen que los DF dan lugar a un aumento del metabolismo respiratorio que podría relacionarse con una disfunción metabólica irreversible y un aumento de compuestos intermedios (Lukatkin *et al.*, 2012). Éste último ha sido el comportamiento observado en nuestro caso. A partir del día 14 de almacenamiento se comprobó un efecto significativo de los diferentes tratamientos sobre la actividad respiratoria de los frutos (expresada como producción de CO<sub>2</sub>). En la figura 2 se muestra la evolución de la actividad respiratoria durante los 28 días de almacenamiento. En todos los casos la actividad respiratoria fue aumentando durante el almacenamiento.

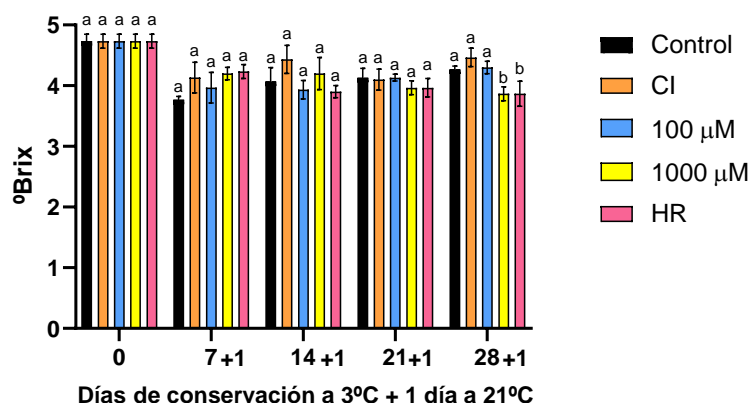




**Figura 2.** Efecto del tipo de tratamiento (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000 µM) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en la tasa respiratoria (ml CO<sub>2</sub>/kg·h) de calabacines conservados a 3°C/28 días + 1 día/21°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey.

Este incremento fue mayor en los calabacines control y los tratados con melatonina en una concentración de 100 µM. Los frutos que presentaron una menor tasa de respiración en la mayoría de los días de análisis fueron los que recibieron CI o los almacenados en condiciones de alta HR. Otros autores han obtenido resultados similares en el calabacín. Comprobaron que 3 ciclos de calentamiento intermitente a 20°C cada 10 días lograron mantener una tasa respiratoria reducida y continua durante todo el período de almacenamiento (Cabrera y Saltveit, 1990; Jiang *et al.*, 2023).

Otro de los parámetros de calidad evaluados fue el contenido en sólidos solubles totales (°Brix). No se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, salvo en el último día de almacenamiento en el que los frutos del lote de alta HR y del tratamiento con melatonina 1000 µM mostraron valores inferiores y significativamente diferentes al resto de lotes. En todos los tratamientos se observó un descenso en el valor de °Brix respecto al valor inicial.

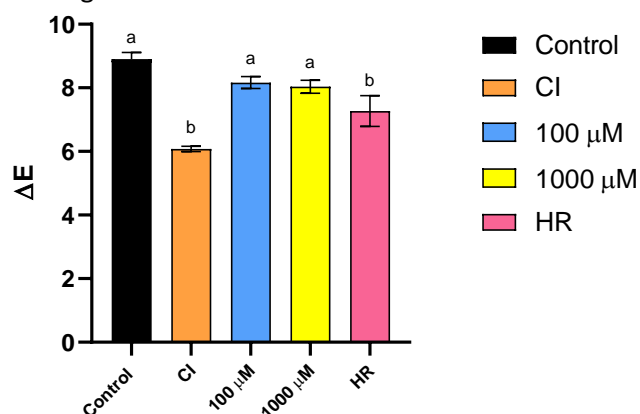


**Figura 3.** Efecto del tipo de tratamiento (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000 µM) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en la cantidad de sólidos solubles (°Brix) de calabacines conservados a 3°C/28 días + 1 día/21°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey.

La influencia de un mayor o menor desarrollo de DF en el contenido de °Brix no está del todo clara. Algunos autores (Chen *et al.*, 2022; Bhardwaj *et al.*, 2022) sí que han observado el

efecto de distintas tecnologías como la aplicación de tratamientos con melatonina o radiaciones UV-C sobre el valor de °Brix en guayaba y en mango. Sin embargo, en otros trabajos se concluye que las mismas técnicas aplicadas en frutos diferentes como el tomate, reducen significativamente (respecto al control) su contenido durante el almacenamiento.

Los cambios de color de la piel del calabacín (de verde intenso a tonos amarillentos) durante su almacenamiento están normalmente relacionados con una fase de senescencia y una mayor severidad de DF (Zhang *et al.*, 2019). En nuestro caso las diferencias encontradas en las coordenadas de color instrumental ( $L^*a^*b^*$ ) entre tratamientos no resultaron significativos (datos no mostrados). Sin embargo, al determinar el parámetro  $\Delta E$ , definido como la diferencia de color y en nuestro caso calculada respecto al color inicial de los frutos, se pudo comprobar como los calabacines almacenados en condiciones de elevada HR así como los que recibieron los CI durante la conservación, consiguieron frenar esa pérdida de color verde intenso, mostrando valores de  $\Delta E$  significativamente inferiores al resto de lotes.



**Figura 4.** Efecto del tipo de tratamiento (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000  $\mu M$ ) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en la diferencia de color entre el día inicial y el día 21 ( $\Delta E$ ) de calabacines conservados a 3°C/28 días + 1 día/21°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey.

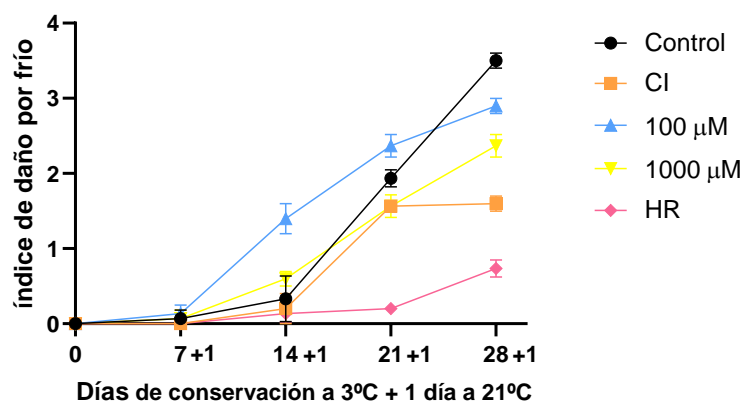
Zuo, Cao, Jia *et al.* (2021) obtuvieron resultados similares también en calabacín. Realizaron el estudio durante 15 días y al final del almacenamiento comprobaron que los frutos control experimentaron un mayor cambio de color (pérdida de verde fundamentalmente) en comparación con los calabacines almacenados a alta HR (96-100 %). Otras técnicas como la aplicación de recubrimientos comestibles (Jafari, Zandi y Ganjloo, 2022) también consiguieron mantener valores de  $L^*a^*b^*$  similares al valor inicial durante el almacenamiento de calabacines durante 15 días en temperaturas de daño.

## 6.2. Daño por frío e integridad de la membrana

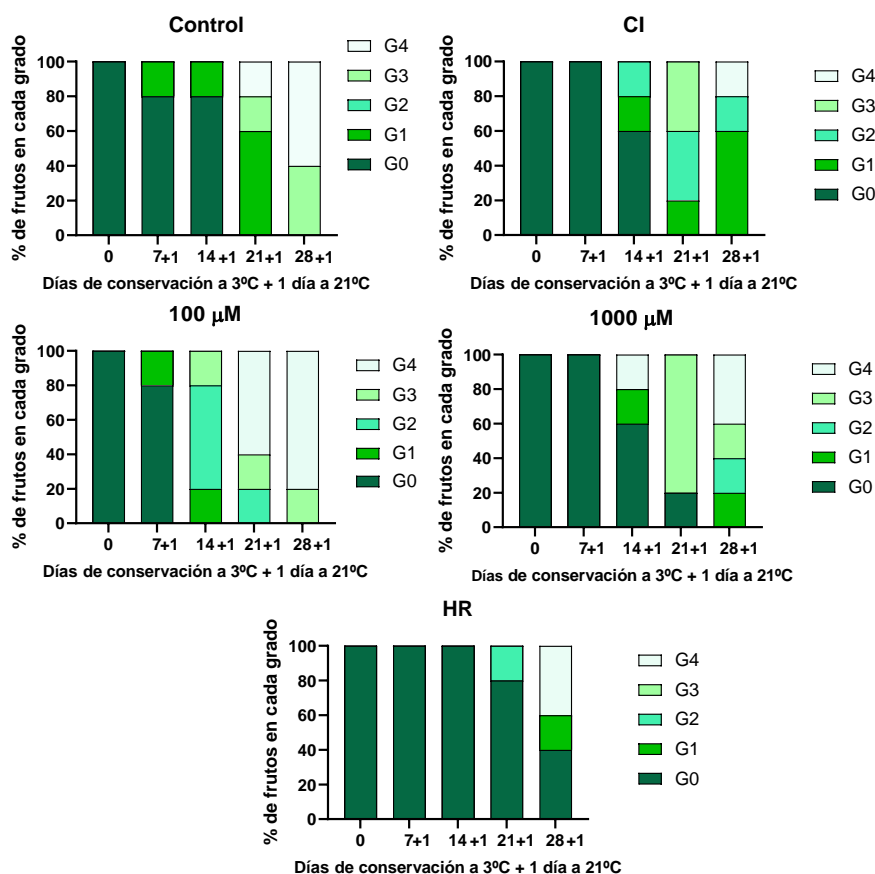
El índice de daño por frío fue evaluado en función de dos parámetros, el porcentaje del fruto afectado y el grado de severidad de los daños, según la escala descrita en el apartado 5.3.

Los síntomas observados fueron la aparición de depresiones sobre la superficie de la piel «pitting», además de zonas húmedas y oscuras y ablandamiento de algunas zonas del fruto por deshidratación.

En las siguientes figuras se muestra el índice de DF, así como la distribución porcentual de los grados de severidad encontrados en los diferentes días de análisis para cada uno de los tratamientos.



**Figura 5.** Efecto del tipo de tratamiento (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000 µM) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en el índice de DF en calabacines conservados a 3°C/28 días + 1 día/21°C.



**Figura 6.** Evolución y distribución porcentual de los frutos en cada grado de severidad de DF (Grado 0 corresponde a lesiones muy leves; Grado 1, lesión leve; Grado 2, moderada; Grado3, daños graves y grado 4, muy graves) en cada uno de los tratamientos (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000 µM) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en calabacines conservados a 3°C/28 días+ 1 día/21°C.

Ninguno de los lotes, salvo el tratado con melatonina presentó síntomas de DF importantes hasta después de los 14 días de almacenamiento. A diferencia de lo mostrado por otros autores (Bhardwaj *et al.* 2022; Hassanzadeh Khankahdani y Rahimzadeh, 2020; Madebo *et al.*, 2021 Rastegar, Hassanzadeh Khankahdani y Rahimzadeh, 2020), en nuestro estudio no observamos un efecto positivo de este tipo de estrategia, ni con la concentración de 100  $\mu\text{M}$  ni con una concentración superior de 1000  $\mu\text{M}$ . De hecho, en nuestro caso, los frutos tratados con este compuesto expresaron una menor tolerancia a los DF y fueron los que mostraron una sintomatología más severa desde el comienzo del estudio. También fueron los que sufrieron la mayor pérdida de peso y mostraron un metabolismo respiratorio más acelerado (ver figura 5). En el día 21 de conservación la mayoría de los lotes mostraron un índice de DF cercano a 2, valores similares a los obtenidos por Liu, Jahangir y Ying (2012) en tomate almacenado durante 10 días/2°C, pero más elevados a los descritos en calabacín por Zhang *et al.* (2019).

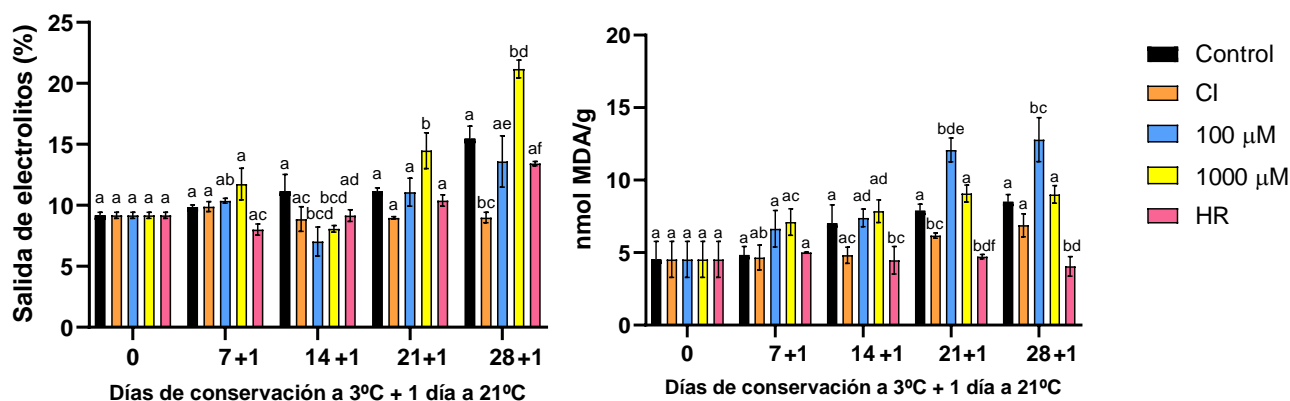
El almacenamiento en condiciones de alta HR logró aumentar la tolerancia del fruto al DF, mostrando valores de índice de DF inferiores al 0,5 en el día 21 y no superior a 1 en el último día de almacenamiento. En este caso, a los 21 días el 80% de los calabacines no mostraron ningún síntoma y en el 20% la sintomatología observada fue muy leve. Es decir, casi el 100% de los frutos mostraban una calidad similar al día inicial. En el último día (día 28), el 60% siguió sin mostrar síntomas evidentes de daño (ver figura 2 del Anexo I).

### 6.3. Parámetros implicados en la integridad de la membrana

La integridad de la membrana celular se ve afectada con el almacenamiento a temperaturas de daño por frío. Se trata de un efecto secundario causado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno que da lugar a la peroxidación de los lípidos de membrana favoreciendo un cambio en su estructura, pasando de flexible a sólida. La fase de transición de las membranas de las células ocurre a temperaturas de daño en vegetales sensibles a los DF. Las membranas pasan de tener estructura flexible líquido-cristalina a tener una estructura de gel sólida, provocando cambios en sus propiedades y en la actividad de los enzimas de membrana (Lukatkin *et al.*, 2012). Estos cambios llegan a ser irreversibles si la exposición a las temperaturas de daño es prolongada y coincide con la aparición de los primeros síntomas visibles. Este cambio está asociado a una mayor permeabilidad de las membranas que provoca una mayor salida de solutos y un aumento del contenido de malondialdehído (MDA). El desarrollo del pitting o depresiones de color oscuro en la piel del calabacín, son el resultado de la pérdida de integridad de las membranas causada por los daños en la pared o membrana celular. La relación de esta alteración de membrana y la mayor o menor tolerancia a los DF ha sido ampliamente estudiada

encontrando una correlación positiva con la peroxidación lipídica y la salida de electrolitos (Carvajal *et al.*, 2015). En muchas investigaciones estos parámetros son utilizados como indicadores de DF (Tomita *et al.*, 2023).

En la figura 8, se muestra el efecto de cada uno de los tratamientos ensayados en ambos parámetros.

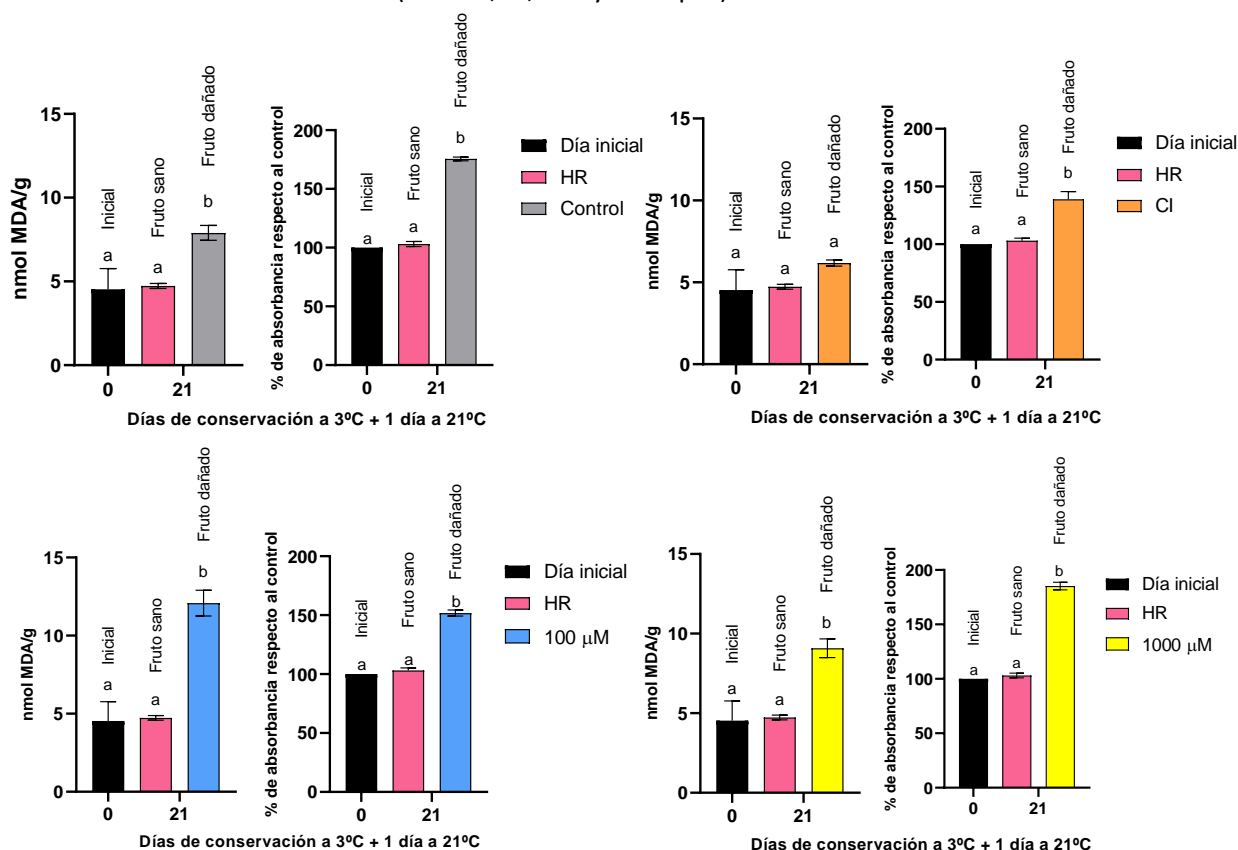


**Figura 7.** Efecto del tipo de tratamiento (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000 µM) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en la salida de electrolitos y en el contenido de malondialdehído (MDA) de calabacines conservados a 3°C/28 días + 1 día/21°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey.

Sí bien es cierto que se observó una mayor salida de electrolitos en los lotes que mostraron un índice de DF más alto (control, 100 µM y 100 µM), el contenido de MDA fue un indicador más adecuado. Se comprobó desde el día 14 que las diferencias en la concentración de MDA fueron significativas entre los lotes con menos tolerancia y los lotes en los que se consiguió controlar el desarrollo de daño (CI o HR).

Además de la salida de electrolitos y el contenido en MDA, analizamos otro parámetro que nos permitió evaluar la influencia de los diferentes tratamientos sobre el mantenimiento de la integridad de la membrana, la tasa de muerte celular y que juega un papel importante en las respuestas al estrés en los productos hortícolas. Los mecanismos reguladores de la muerte celular no están bien definidos, pero diversos estudios han demostrado la muerte de las células vegetales inducida por otros factores ambientales como el ozono (Overmyer *et al.*, 2005), el estrés por calor (Zuppin *et al.*, 2006) o la radiación UV (Danon *et al.*, 2004). En la figura 9 se presenta, de forma paralela la relación entre el contenido de MDA (mejor indicador en nuestro

caso), con la tasa de muerte celular en frutos sanos del lote HR (sin sintomatología) y frutos dañados de los otros lotes (control, CI, 100 y 1000  $\mu$ M) tras 21 días de almacenamiento.



**Figura 8.** Efecto del tipo de tratamiento (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000  $\mu$ M) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en la muerte celular (% de absorbancia) de calabacines conservados a 3°C/21 días + 1 día/21°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey.

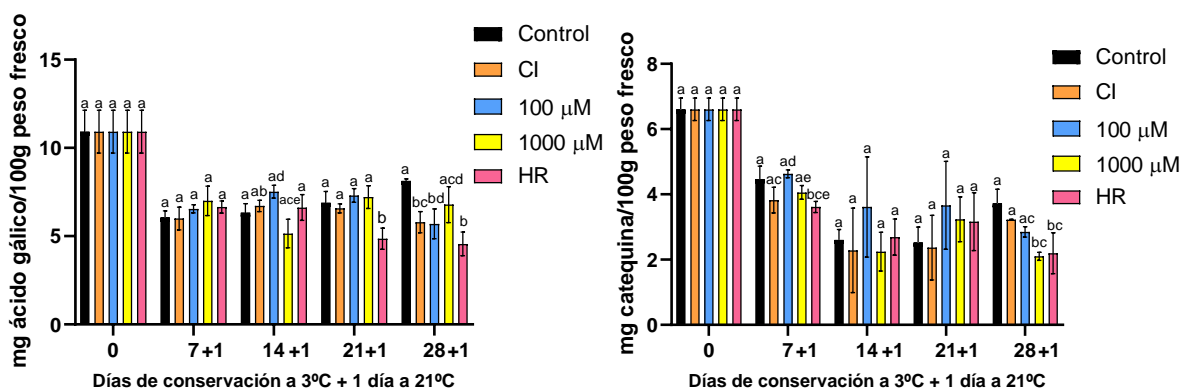
Varios autores han observado también esta correlación positiva en diferentes productos en los que se han aplicado distintas técnicas de control: calabacín con alta HR (Zuo *et al.*, 2022); tratamiento en calabacín con agua caliente (Zhang *et al.*, 2019); mango con fenilalanina (Sogvar *et al.*, 2020); melocotón tratado con melatonina (Gao *et al.*, 2018). En todos ellos, los frutos con sintomatología mostraron valores de tasa de muerte celular comprendidos entre 95 y 105% de absorbancia respecto al control en tejidos sanos, mientras que en tratamientos que dieron lugar a tejidos con daños los valores aumentaron significativamente hasta un 300% de absorbancia con respecto al control.

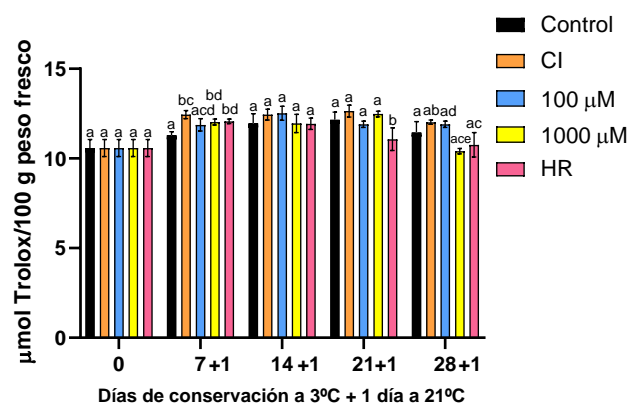
En nuestro caso está claro que tanto el CI como el almacenamiento en alta HR en mayor medida, permitieron reducir la salida de electrolitos, la muerte celular y al acúmulo de MDA, parámetros todos ellos asociados a un menor daño de membrana y al mantenimiento de su integridad.

#### 6.4. Parámetros asociados a los diferentes mecanismos de defensa del fruto

Actualmente existen dos hipótesis acerca de los mecanismos bioquímicos envueltos en la fisiopatía de DF: una es la hipótesis relacionada con el daño de la membrana celular (descrito en el apartado anterior) y otro es la relacionada con el acúmulo de especies reactivas de oxígeno derivadas de la respuesta del fruto a las condiciones de estrés. Frente al acúmulo de estas sustancias (ROS), las plantas poseen dos tipos de mecanismos de defensa, el mecanismo enzimático y el no enzimático. En el primero están implicados enzimas como la catalasa, glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa que se encargan de eliminar y neutralizar compuestos intermedios implicados en la generación de esas sustancias tóxicas (Gualanduzzi et al., 2009). En el segundo, entran en juego diferentes compuestos con actividad antioxidante como los fenoles totales o flavonoides. Ambos mecanismos se ponen en marcha cuando el fruto es sometido a algún tipo de estrés, como es el caso de las bajas temperaturas en el caso de los productos sensibles a ellas. En el presente TFG se evaluó la influencia de los diferentes tratamientos aplicados sobre la tolerancia del calabacín a los DF así como su relación con la activación de su mecanismo de defensa no enzimático. Para ello, se analizó el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante total durante los 28 días de almacenamiento.

De acuerdo con lo mostrado en la figura 10, tanto el contenido de fenoles totales como el de flavonoides sufrió un descenso desde el valor inicial en todos los lotes y durante todo el período de almacenamiento, yendo desde una concentración de 11 mg ácido gálico/100 g peso fresco hasta de 4 a 6 mg ácido gálico/100 g peso fresco en el resto de tratamientos. Aunque no en todos los días de análisis, sí que se detectaron diferencias significativas en el contenido de estos compuestos en los calabacines tratados con alta HR (con menos daño expresado) y los frutos control.





**Figura 9.** Efecto del tipo de tratamiento (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000 μM) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) en el contenido de compuestos fenólicos totales, concentración de flavonoides y capacidad antioxidante total (MDA) de los calabacines conservados a 3°C/28 días + 1 día/21°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey.

La relación entre una mayor y menor tolerancia al daño y la concentración de estos compuestos no está todavía muy clara. Algunos autores (García-Pastor *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018) mantienen la hipótesis de que una mayor concentración de fenoles totales o flavonoides está relacionada con una mayor tolerancia. De hecho, varias investigaciones demuestran que la aplicación de diferentes técnicas de control son eficaces por conseguir una mayor síntesis de estos compuestos que a su vez consiga una mayor neutralización de sustancias ROS derivadas del daño ocurrido. En nuestro caso, los calabacines que expresaron menor daño fueron los que presentaron una concentración más baja de fenoles totales y flavonoides, lo que coincidiría con otra hipótesis planteada por otros autores como Liu *et al.* (2012). Según estos, las técnicas que aumentan la tolerancia del fruto hacen que los mecanismos protectores del estrés estén menos activados, y por lo tanto, haya menos acúmulo de compuestos secundarios (originados como respuesta al estrés). En sus trabajos se asocia un menor acúmulo de sustancias con capacidad antioxidante a una mejor tolerancia del fruto al DF, basándose en una mejor adaptación del producto a esas temperaturas y que no haría necesario la activación de los mecanismos de defensa de la planta que ponen en marcha la síntesis de estos metabolitos secundarios.

Con el objetivo de identificar aquellos parámetros o mecanismos implicados en mayor medida sobre los procesos conducentes a un mayor o menor desarrollo de los DF en calabacín, se han calculado diferentes coeficientes de correlación de Pearson entre los diferentes tipos de parámetros analizados (tanto los implicados en el mantenimiento de la integridad de membrana como los asociados a la puesta en marcha de los mecanismos de defensa de la planta frente a situaciones de estrés) y el índice de daño por frío observado en el último día de almacenamiento. Los resultados se presentan en la tabla 2:



**Tabla 2.** Coeficiente de correlación simple de Pearson entre índice de daños por frío (DF), contenido en malondialdehído (MDA), salida de electrolitos (Electrolitos %), muerte celular, fenoles totales (FT), flavonoides totales (Flavonoides) y capacidad antioxidante (DPPH) evaluados en los diferentes tratamientos realizados en calabacines conservados a 3°C/28 días + 1 día/21°C.

	DF	MDA	Electrolitos (%)	Muerte celular	FT	Flavonoides	DPPH
Índice DF	1	0,791*	0,002	0,312	-0,232	-0,442**	0,213
MDA	0,791*	1	-0,016	0,485	-0,272	-0,396	0,334
Electrolitos (%)	0,002	-0,016	1	0,094	0,569*	0,473**	-0,804*
Muerte celular	0,312	0,485**	0,094	1	-0,296	-0,398**	0,176
FT	-0,232	-0,272	0,569*	-0,296	1	0,878*	-0,542*
Flavonoides	-0,442**	-0,396	0,473**	-0,398**	0,878	1	-0,588
DPPH	0,213	0,334	-0,804*	0,176	-0,542*	-0,588*	1

Los valores \* y \*\* representan diferencias significativas en  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente.

Se ha comprobado que de todos los parámetros analizados, el contenido en MDA (con una correlación positiva de  $r^2$  0,791) y la concentración de flavonoides (con una correlación negativa) son los que mostraron la mayor relación con la severidad del daño observado.

## 7. CONCLUSIONES

1. El almacenamiento en elevada HR ( $98 \pm 1,5\%$ ) reduce significativamente los principales efectos negativos de la frigoconservación en los frutos de calabacín, como son el desarrollo de pitting en la piel, la pérdida de peso por deshidratación y el ablandamiento, retrasando hasta el día 28 de almacenamiento la aparición de daños por frío.
2. El tratamiento con melatonina aplicado en 2 concentraciones diferentes (100  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M) provocó numerosos daños en los calabacines, observándose un pitting muy severo y ciertas zonas deshidratadas a partir del 14º día de almacenamiento. Por su parte, la aplicación de calentamientos intermitentes (21°C durante 24 h tras cada 7 días de almacenamiento) permitió reducir el desarrollo de DF aunque no de forma tan eficaz como el almacenamiento a elevada HR.
3. De los parámetros analizados, el contenido en malondialdehído, así como la tasa de muerte celular fueron los que mostraron una correlación más elevada con la severidad del daño observado. Tanto la aplicación de CI como el almacenamiento en elevada HR permitieron mantener la integridad de la membrana celular en mayor medida, mostrando valores inferiores tanto de MDA acumulado como de muerte celular.
4. Los compuestos antioxidantes (fenoles totales y flavonoides) implicados en el mecanismo de defensa de las plantas iniciado frente a situaciones de estrés se encontraron en menor concentración en los calabacines que mostraron un menor daño (almacenados a alta HR), lo que estaría relacionado con un aumento de tolerancia del fruto a las bajas temperaturas.

5. Un porcentaje de HR cercano a saturación durante el almacenamiento en frío permite aumentar la tolerancia del fruto al desarrollo de daños por frío aumentando su vida útil en, al menos, 14 días respecto al fruto control (sin ningún tipo de tratamiento), siendo además una tecnología sencilla y de fácil implantación que podría aplicarse tanto durante el transporte como durante el almacenamiento en la central hortofrutícola.

## **8. CONCLUSIONES EN INGLÉS**

1. Storage at high RH ( $98 \pm 1.5\%$ ) significantly reduces the main negative effects of cold storage on zucchini fruits, such as the development of pitting on the skin, weight loss due to dehydration and softening, delaying until the 28th day of storage the appearance of cold damage.
2. The treatment with melatonin applied in 2 different concentrations (100  $\mu$ M and 1000  $\mu$ M) found numerous damages in the zucchini, observing a very severe pitting and certain dehydrated areas from the 14th day of storage. For its part, the application of intermittent warmings (21°C for 24 h after every 7 days of storage) made it possible to reduce the development of DF, although not as effectively as storage at high HR.
3. Of the parameters analyzed, the malondialdehyde content, as well as the cell death rate, were the ones that showed a higher affectation with the severity of the damage observed. Both the application of CI and the storage at high HR allowed to maintain the integrity of the cell membrane to a greater extent, showing lower values of both accumulated MDA and cell death.
4. The antioxidant compounds (total phenols and flavonoids) involved in the defense mechanism of plants initiated against stress situations were found in lower concentrations in zucchini that showed less damage (stored at high HR), which would be related with an increased tolerance of the fruit to low temperatures.
5. A percentage of RH close to saturation during cold storage allows increasing the tolerance of the fruit to the development of cold damage, increasing its useful life by at least 14 days compared to the control fruit (without any type of treatment), so it is a simple and easy-to-install technology that could be applied both during transport and during storage in the fruit and vegetable center.

## **9. VALORACIÓN PERSONAL**

La realización del presente TFG me ha permitido aprender numerosos conocimientos y habilidades relativos a la ciencia de la postcosecha. Además, este trabajo me ha brindado la

oportunidad de poner en práctica muchas de las competencias adquiridas a lo largo del grado y assimilar cómo se desarrolla un estudio de investigación.

A través de este proyecto, he logrado ser capaz de gestionar el tiempo y organizarme adecuadamente durante la realización de las diferentes técnicas analíticas llevadas a cabo. También me ha ayudado a ser más autónoma en el laboratorio, además de conocer diferentes equipos que han sido utilizados durante el estudio de investigación.

Por último, quiero destacar el apoyo y dedicación de mis tutoras, que me han ayudado en todo momento, tanto en el laboratorio como fuera de él.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

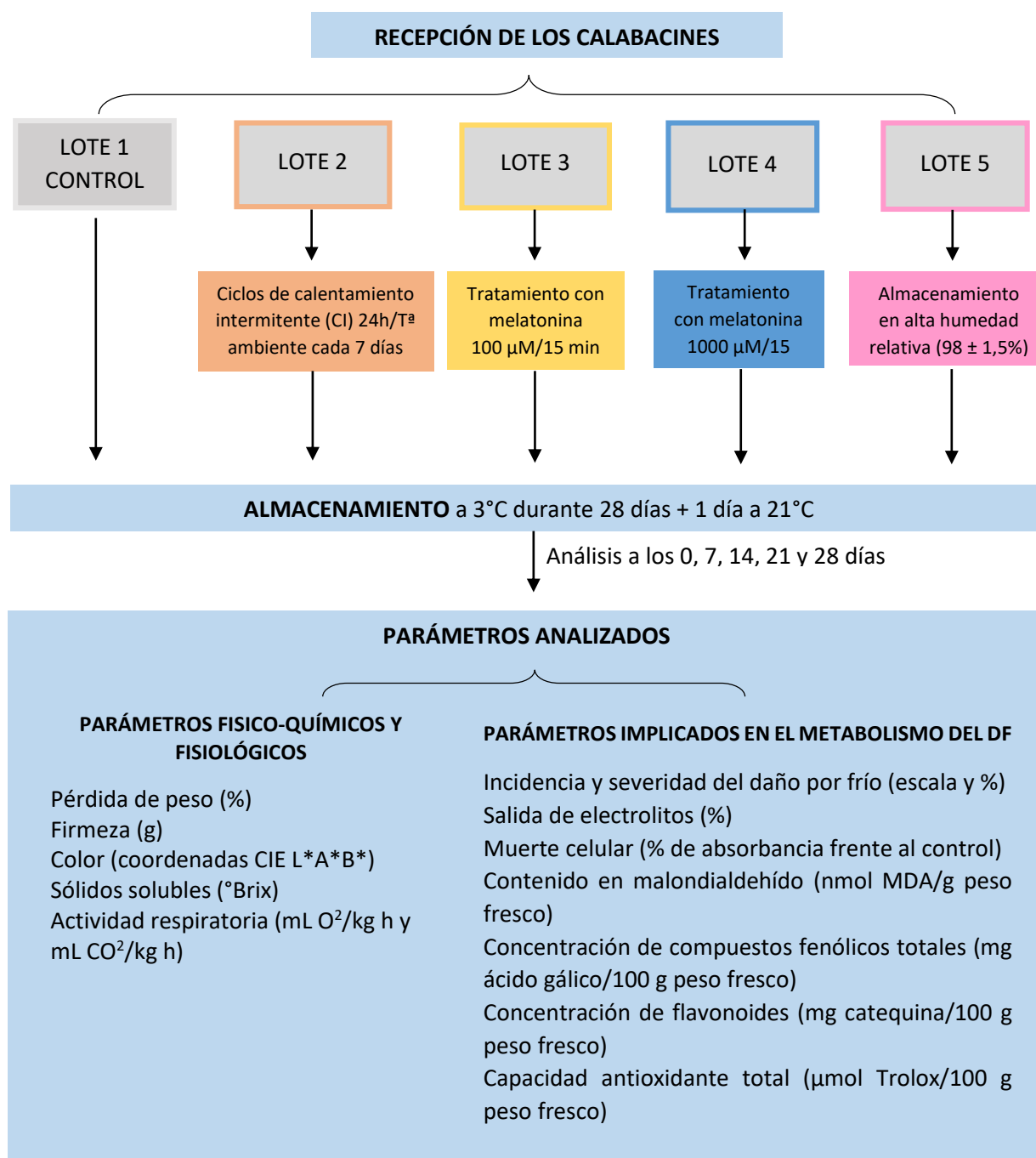
- Aghdam, M. S. y Bodbodak, S. (2013) "Physiological and biochemical mechanisms regulating chilling tolerance in fruits and vegetables under postharvest salicylates and jasmonates treatments", *Scientia horticulturae*, 156, pp. 73–85. doi: 10.1016/j.scienta.2013.03.028.
- Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O. y Baker, R. A. (1995) "Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables", *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*, 30(1), pp. 35–38. doi: 10.21273/hortsci.30.1.35.
- Bhardwaj, R. et al. (2022) "A melatonin treatment delays postharvest senescence, maintains quality, reduces chilling injury, and regulates antioxidant metabolism in mango fruit", *Journal of food quality*, 2022, pp. 1–18. doi: 10.1155/2022/2379556.
- Biswas, P. et al. (2012) "Intermittent warming during low temperature storage reduces tomato chilling injury", *Postharvest biology and technology*, 74, pp. 71–78. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.07.002.
- Cabrera, R. M. y Saltveit, M. E. (1990) "Physiological response to chilling temperatures of intermittently warmed cucumber fruit", *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, 115(2), pp. 256–261. doi: 10.21273/jashs.115.2.256.
- Cantwell, M. I. y Kasmire, R. F. (2007) "Sistemas de manejo postcosecha: Hortalizas de fruto", 33, pp. 457–474.
- Carvajal, F. et al. (2015) "Cell wall metabolism and chilling injury during postharvest cold storage in zucchini fruit", *Postharvest biology and technology*, 108, pp. 68–77. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.05.013.
- Castro-Cegri, A. et al. (2023) "Application of polysaccharide-based edible coatings to improve the quality of zucchini fruit during postharvest cold storage", *Scientia horticulturae*, 314(111941), p. 111941. doi: 10.1016/j.scienta.2023.111941.
- Chaudhary, P. R. et al. (2014) "Low temperature conditioning reduces chilling injury while maintaining quality and certain bioactive compounds of 'Star Ruby' grapefruit", *Food chemistry*, 153, pp. 243–249. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.043.
- Chen, H. et al. (2022) "Amelioration of chilling injury and enhancement of quality maintenance in cold-stored guava fruit by melatonin treatment", *Food chemistry: X*, 14(100297), p. 100297. doi: 10.1016/j.fochx.2022.100297.
- Danon, A. et al. (2004) "Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activity and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death", *J Biol Chem*, 279, pp. 779–787.
- Duong, N. T. C. et al. (2022) "An innovative single step of cross-linked alginate-based edible coating for maintaining postharvest quality and reducing chilling injury in rose apple cv. 'Tabtimchan' (Syzygium samarangense)", *Scientia horticulturae*, 292(110648), p. 110648. doi: 10.1016/j.scienta.2021.110648.
- Etemadipoor, R. et al. (2020) "Ameliorative effect of gum arabic, oleic acid and/or cinnamon essential oil on chilling injury and quality loss of guava fruit", *Scientia horticulturae*, 266(109255), p. 109255. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109255.

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021) *Frutas y hortalizas*. Rome, Italy: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Gao, H. *et al.* (2016) "Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit", *Postharvest biology and technology*, 118, pp. 103–110. doi: 10.1016/j.postharvbio.2016.03.006.
- Gao, H. *et al.* (2018) "Melatonin treatment reduces chilling injury in peach fruit through its regulation of membrane fatty acid contents and phenolic metabolism", *Food chemistry*, 245, pp. 659–666. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.008.
- García-Pastor, M. E. *et al.* (2020) "Preharvest or a combination of preharvest and postharvest treatments with methyl jasmonate reduced chilling injury, by maintaining higher unsaturated fatty acids, and increased aril colour and phenolics content in pomegranate", *Postharvest biology and technology*, 167(111226), p. 111226. doi: 10.1016/j.postharvbio.2020.111226.
- Gualanduzzi, S. *et al.* (2009) "Respiration, hydrogen peroxide levels and antioxidant enzyme activities during cold storage of zucchini squash fruit", *Postharvest biology and technology*, 52(1), pp. 16–23. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.09.010.
- Hassan, B. *et al.* (2018) "Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review", *International journal of biological macromolecules*, 109, pp. 1095–1107. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097.
- Iacopini, P. *et al.* (2010) "Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of Malus×domestica Borkh. in a peroxynitrite-induced oxidative process", *Journal of food composition and analysis: an official publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 23(6), pp. 518–524. doi: 10.1016/j.jfca.2009.05.004.
- Jafari, R., Zandi, M. y Ganjloo, A. (2022) "Effect of gelatin–alginate coating containing anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on physicochemical and visual properties of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) fruit during storage", *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(8), pp. 175–185.
- Jannatizadeh, A. (2019) "Exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in pomegranate fruit during cold storage", *Scientia horticulturae*, 246, pp. 544–549. doi: 10.1016/j.scienta.2018.11.027.
- Jiang, L. *et al.* (2023) "Intermittent stepwise cooling and warming ameliorate chilling injury and improve quality in postharvest 'Guifei' mango fruit", *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]*, 181(114740), p. 114740. doi: 10.1016/j.lwt.2023.114740.
- Jiménez-Muñoz, R. *et al.* (2021) "Pre-storage nitric oxide treatment enhances chilling tolerance of zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) by S-nitrosylation of proteins and modulation of the antioxidant response", *Postharvest biology and technology*, 171(111345), p. 111345. doi: 10.1016/j.postharvbio.2020.111345.
- Fahmy, K. y Nakano, K. (2013) "Influence of relative humidity on development of chilling injury of cucumber fruits during low temperature storage", *J. Sustain. Agric. Food Energy*, 1, pp. 1–5. doi: 10.36782/apjsafe.v1i1.356
- Lafuente, M. T. *et al.* (1991) "Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons: possible role of ABA and heat shock proteins", *Plant Physiol*, 95, pp. 443–449.
- Liu, C., Jahangir, M. M. y Ying, T. (2012) "Alleviation of chilling injury in postharvest tomato fruit by preconditioning with ultraviolet irradiation: Effect of UV on chilling injury in tomatoes", *Journal of the science of food and agriculture*, 92(15), pp. 3016–3022. doi: 10.1002/jsfa.5717.
- Liu, H. *et al.* (2018) "A combination of 1-methylcyclopropene treatment and intermittent warming alleviates chilling injury and affects phenolics and antioxidant activity of peach fruit during storage", *Scientia horticulturae*, 229, pp. 175–181. doi: 10.1016/j.scienta.2017.11.010.
- Liu, L. *et al.* (2015) "Intermittent warming improves postharvest quality of bell peppers and reduces chilling injury", *Postharvest biology and technology*, 101, pp. 18–25. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.11.006.
- Llorach, R. *et al.* (2008) "Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole", *Food chemistry*, 108(3), pp. 1028–1038. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.032.
- Lukatkin, A. *et al.* (2012). "Chilling injury in chilling-sensitive plants: A review", *Zemdirbyste*, 99, pp. 111–124.
- Lukatkin, A.S. (2002) "Contribution of oxidative stress to the development of cold induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: reactive oxygen species formation during plant chilling" *Russ. J. Plant Physiol*, 49, pp. 622–627.

- Madebo, M. P. *et al.* (2021) "Melatonin treatment induces chilling tolerance by regulating the contents of polyamine,  $\gamma$ -aminobutyric acid, and proline in cucumber fruit", *Journal of integrative agriculture*, 20(11), pp. 3060–3074. doi: 10.1016/s2095-3119(20)63485-2.
- Madebo, M. P. *et al.* (2021) "Mechanisms of chilling tolerance in melatonin treated postharvest fruits and vegetables: a review", *Journal of Future Foods*, 1(2), pp. 156–167. doi: 10.1016/j.jfutfo.2022.01.005.
- Mao, L.-C. *et al.* (2007) "Involvement of phospholipase D and lipoxygenase in response to chilling stress in postharvest cucumber fruits", *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 172(2), pp. 400–405. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.10.002.
- MAPA - [Material vegetal] - Ministerio - [mapa.gob.es](https://www.mapa.gob.es) (2022) *Gob.es*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2525> (Consultado: el 26 de mayo de 2023).
- MAPA - *Informe del Consumo Alimentario en España 2021* *Gob.es*. (2021) Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-alimentario-2021-baja-res\\_tcm30-624017.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-alimentario-2021-baja-res_tcm30-624017.pdf) (Consultado: el 26 de mayo de 2023).
- Martínez, J.A. (2021) "Alteraciones fisiológicas, microbianas y daños mecánicos en la postrecolección hortofrutícola", *Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica*, Universidad Politécnica de Cartagena.
- McDonald, R. E., McCollum y Baldwin, E. A. (1996) "Prestorage heat treatments influence free sterols and flavor volatiles of tomatoes stored at chilling temperature" *J Amer Soc Hort Sci*, 121, pp. 531-536.
- Medina-Santamarina *et al.* (2022). "Aplicación de tratamientos postcosecha con melatonina para mantener la calidad y reducir daños por frío en calabacín (*Cucurbita pepo* L.)". En: Arias, E., Remón, S. y Oria, R. (Coord.). *Avances en maduración y poscosecha de frutas y hortalizas*. Zaragoza: Servicio de publicaciones, Universidad de Zaragoza.
- Overmyer, K. *et al.* (2005) "Ozone-induced programmed cell death in the Arabidopsis radical-induced cell death mutant", *Plant Physiol*, 137, pp. 1092–1104.
- Qu, G.-Q. *et al.* (2009) "Evidence for programmed cell death and activation of speciWc caspase-like enzymes in the tomato fruit heat stress response", *Planta Journal*, 229, pp. 1269-1279. doi: 10.1007/s00425-009-0908-4
- Rai, A., Kumari, K. y Vashistha, P. (2022) "Umbrella review on chilling injuries: Post-harvest issue, cause, and treatment in tomato", *Scientia horticulturae*, 293(110710), p. 110710. doi: 10.1016/j.scienta.2021.110710.
- Rastegar, S., Hassanzadeh Khankahdani, H. y Rahimzadeh, M. (2020) "Effects of melatonin treatment on the biochemical changes and antioxidant enzyme activity of mango fruit during storage", *Scientia horticulturae*, 259(108835), p. 108835. doi: 10.1016/j.scienta.2019.108835.
- Razavi, F. *et al.* (2018) "Glycine betaine treatment attenuates chilling injury and maintains nutritional quality of hawthorn fruit during storage at low temperature", *Scientia horticulturae*, 233, pp. 188–194. doi: 10.1016/j.scienta.2018.01.053.
- Salunkhe, D. K. (2004) *Tratado de Ciencia y Tecnología de Las Hortalizas*. ACRIBIA.
- Shiekh, K. A., Ngwngam, K. y Tongdeesontorn, W. (2021) "Polysaccharide-based active coatings incorporated with bioactive compounds for reducing postharvest losses of fresh fruits", *Coatings*, 12(1), p. 8. doi: 10.3390/coatings12010008.
- Siddiq, M. (ed.) (2012) *Tropical and subtropical fruits: Postharvest physiology, processing and packaging*. 1a ed. Hoboken, NJ, Estados Unidos de América: Wiley-Blackwell.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. M. (1999) "[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent", en *Oxidants and Antioxidants Part A*. Elsevier, pp. 152–178.
- Sogvar, O. B. *et al.* (2020) "Phenylalanine alleviates postharvest chilling injury of plum fruit by modulating antioxidant system and enhancing the accumulation of phenolic compounds", *Food technology and biotechnology*, 58(4), pp. 433–444. doi: 10.17113/ftb.58.04.20.6717.
- Thakur, R. *et al.* (2019) "Starch-based edible coating formulation: Optimization and its application to improve the postharvest quality of 'Cripps pink' apple under different temperature regimes", *Food packaging and shelf life*, 22(100409), p. 100409. doi: 10.1016/j.fpsl.2019.100409.
- Tirilly, Y. y Bourgeois, C. M. (2002) *Tecnología de Las Hortalizas*. ACRIBIA.
- Tomás-Barberan, F. A., Ferreres, F. y Gil, M. I. (2000) "Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing", en *Bioactive natural Products (Part D)*. Elsevier, pp. 739–795.

- Tomita, S. *et al* (2023). "Physical, chemical, and physiological characterization of the reactions preceding chilling injury–induced cell membrane damage in cucumber". *Postharvest Biology and Technology*, 201, pp. 112349 DOI: 10.1016/j.postharvbio.2023.112349.
- Wang, C. Y. (1994) "Chilling injury of tropical horticultural commodities", *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*, 29(9), pp. 986–988. doi: 10.21273/hortsci.29.9.986.
- Wang, C. Y. (1996) "Temperature preconditioning affects ascorbate antioxidant system in chilled zucchini squash", *Postharvest biology and technology*, 8(1), pp. 29–36. doi: 10.1016/0925-5214(95)00061-5.
- Wang, C. *et al.* (2016) "Effect of cultivar, temperature, and environmental conditions on the dynamic change of melatonin in mulberry fruit development and wine fermentation: Melatonin in mulberry fruits and wine...", *Journal of food science*, 81(4), pp. M958-67. doi: 10.1111/1750-3841.13263.
- Wang, L. *et al.* (2019) "Glycine betaine reduces chilling injury in peach fruit by enhancing phenolic and sugar metabolisms", *Food chemistry*, 272, pp. 530–538. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.08.085.
- Wang, Y. *et al.* (2013) "Effect of nitric oxide on antioxidative response and proline metabolism in banana during cold storage", *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(37), pp. 8880–8887. doi: 10.1021/jf401447y.
- Wang, Z. *et al.* (2022) "Melatonin maintained higher contents of unsaturated fatty acid and cell membrane structure integrity in banana peel and alleviated postharvest chilling injury", *Food chemistry*, 397(133836), p. 133836. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133836.
- Zhang, M. *et al.* (2019) "Postharvest hot water dipping and hot water forced convection treatments alleviate chilling injury for zucchini fruit during cold storage", *Scientia horticulturae*, 249, pp. 219–227. doi: 10.1016/j.scienta.2019.01.058.
- Zhang, W. y Jiang, W. (2019) "UV treatment improved the quality of postharvest fruits and vegetables by inducing resistance", *Trends in food science & technology*, 92, pp. 71–80. doi: 10.1016/j.tifs.2019.08.012.
- Zhang, W. *et al.* (2021) "Advances in biochemical mechanisms and control technologies to treat chilling injury in postharvest fruits and vegetables", *Trends in food science & technology*, 113, pp. 355–365. doi: 10.1016/j.tifs.2021.05.009.
- Zhang, W., Zhao, H., *et al.* (2020) "Multiple 1-MCP treatment more effectively alleviated postharvest nectarine chilling injury than conventional one-time 1-MCP treatment by regulating ROS and energy metabolism", *Food chemistry*, 330(127256), p. 127256. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127256.
- Zhang, X. *et al.* (2021) "Calcium ion improves cold resistance of green peppers (*Capsicum annuum* L.) by regulating the activity of protective enzymes and membrane lipid composition", *Scientia horticulturae*, 277(109789), p. 109789. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109789.
- Zhang, Z. *et al.* (2017) "Low-temperature conditioning induces chilling tolerance in stored mango fruit", *Food chemistry*, 219, pp. 76–84. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.123.
- Zuo, X. *et al.* (2021) "High relative humidity (HRH) storage alleviates chilling injury of zucchini fruit by promoting the accumulation of proline and ABA", *Postharvest biology and technology*, 171(111344), p. 111344. doi: 10.1016/j.postharvbio.2020.111344.
- Zuo, X. *et al.* (2022) "High relative humidity enhances chilling tolerance of zucchini fruit by regulating sugar and ethanol metabolisms during cold storage", *Postharvest biology and technology*, 189(111932), pp. 111932. doi: 10.1016/j.postharvbio.2022.111932.
- Zuo, X., Cao, S., Jia, W., *et al.* (2021) "Near-saturated relative humidity alleviates chilling injury in zucchini fruit through its regulation of antioxidant response and energy metabolism", *Food chemistry*, 351(129336), p. 129336. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129336.
- Zuppin, A. *et al.* (2006) "Monitoring programmed cell death triggered by mild heat shock in soybean-cultured cells", *Funct Plant Biol*, 33, pp. 617–662.

# **ANEXO I**



**Figura 1. Anexo I.** Desarrollo experimental seguido en el estudio de la eficacia de diferentes tecnologías frente al control de los daños por frío en calabacín.





**Figura 2. Anexo I.** Aspecto externo de los calabacines de los diferentes tratamientos (calentamiento intermitente (CI) (21°C/24h cada 7 días); tratamiento por inmersión en melatonina (100/1000  $\mu$ M) y almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa (HR) (98%)) conservados a 3°C/28 días+ 1 día/21°C.