Actas del II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad agroalimentaria- 2021



Editores: Dr. Santiago García Martínez y Dra. María Serrano Mula

Escuela Politécnica Superior de Orihuela
EPSO

UNIVERSITAS Miguel Hernández

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)

16 al 17 de Septiembre de 2021

Actas del II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria - 2021

Editores:

Dr. Santiago García Martínez y Dra. María Serrano Mula

ISBN:

978-84-18177-16-3

Fecha de edición:
10/11/2021

Editorial:
Universidad Miguel Hernández de Elche

Maquetación:

Servicio de Innovación y Planificación Tecnológica (SIPT)

La Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en su afán de promover el intercambio de conocimiento entre los estudiantes y jóvenes investigadores, ha organizado el **II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria** (CUISA), celebrado los días 16 y 17 de septiembre de 2021 en modalidad on-line.

En este congreso se inscribieron 110 participantes y se presentaron 77 comunicaciones, 63 de ellas de forma oral y 14 como póster, por jóvenes investigadores, pertenecientes a estudios de Máster y de Doctorado, o recientemente doctorados. La mayoría de los participantes en este congreso han sido españoles, aunque también cabe destacar participantes de otros países como México, Ecuador, Colombia o Mozambique.

Las comunicaciones se presentaron en 12 sesiones temáticas que abarcaron diferentes aspectos de la producción agrícola y ganadera, desde los recursos genéticos, las técnicas de producción más novedosas, hasta el aprovechamiento de sub-productos y la economía de las empresas agroalimentarias, siempre desde un punto de vista medioambiental y sostenible y con especial énfasis en la producción de productos de excelente calidad y con beneficios para la salud de los consumidores.

Finalmente, queremos destacar la elevada calidad científica de las comunicaciones presentadas en el congreso y que se recogen en la presente publicación, que según se desprende de su el título, es la segunda de una larga serie de futuros congresos.

Dr. Santiago García-Martínez

Dra. María Serrano

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente: Dr. Santiago García Martínez

Secretaria: Dra. Francisca Hernández García

Secretaría Administrativa: Oficina de Congresos UMH

Vocales

Dr. Ricardo Abadía Sánchez, EPSO-UMH

Dra. María José Argente Carrascosa, EPSO-UMH

D. José Cordero Gracia, EPSO-UMH

Dra. Juana Fernández López, EPSO-UMH

Dra. María Teresa Ferrández García, EPSO-UMH

Dr. Manuel Ferrández-Villena García, EPSO-UMH

Dra. Pilar Legua Murcia, EPSO-UMH

Dra. Laura Martínez-Carrasco Martínez, EPSO-UMH

Dr. Antonio Martínez Gabarrón, EPSO-UMH

Dra. Casilda Navarro Rodríguez De Vera, EPSO-UMH

Dr. Luis Noguera Artiaga, EPSO-UMH

Dra. Mª Desamparados Melian Navarro, EPSO-UMH

Dra. Concepción Paredes Gil, EPSO-UMH

Dra. Gema Romero Moraleda, EPSO-UMH

Dr. Antonio Ruiz Canales, EPSO-UMH

Dra. María Estrella Sayas Barberá, EPSO-UMH

Dra. Esther Sendra Nadal, EPSO-UMH

Dr. Pedro Javier Zapata Coll, EPSO-UMH

COMITÉ CIENTÍFICO

Dra. María Serrano Mula **(Presidenta)**

Dra. Nuria Alburquerque Ferrando, CEBAS-CSIC Murcia

Dr. Alberto S. Atzori, Universidad de Sassari (Italia)

Dr. Rodolfo Bernabeu Cañete, Universidad de Castilla la Mancha

Dra. Margarita Brugarolas Mollá-Bauzá, EPSO-UMH

Dr. Salvador Castillo García, EPSO-UMH

Dr. José Enrique Cos Terrer, IMIDA Murcia

Dra. Mª Dolores de Miguel Gómez, UPCT

Dr. José María Egea Fernández, UMU

Dra. Concepción Fabeiro Cortés, UCLM

Dra. Mª Ángeles Fernández Zamudio, IVIA Valencia

Dra. María José Frutos Fernández, EPSO-UMH

Dr. Alejandro Galindo Egea, Universidad de Sevilla

Dr. Jesús García Brunton, IMIDA Murcia

Dra. Cristina García Viguera, CEBAS-CSIC Murcia

Dra. Rocío González Barrio, Universidad de Murcia

Dr. Diego Intrigiolo Molina, CIDE-CSIC/UV/GVA

Dr. Andrés Fernando Jiménez López, Universidad de Los Llanos (Colombia)

Dr. José Manuel Lorenzo Rodríguez, Universidad de Vigo

Dr. Pedro Martínez Gómez, CEBAS-CSIC Murcia

Dr. Domingo Jesús Martínez Romero, EPSO-UMH

Dr. Pablo Melgarejo Moreno, EPSO-UMH

Dra. Mª Dolores de Miguel Gómez, UPCT

Dr. José Miguel Molina Martínez, UPCT

Dr. Raúl Moral Herrero, EPSO-UMH

Dra. María Jesús Pascual Villalobos, IMIDA Murcia

Dr. José Ángel Pérez Álvarez, EPSO-UMH

Dra. Aurelia Pérez Espinosa, EPSO-UMH

Dra. Herminia Puerto Molina, EPSO-UMH

Dra. Carmen Rocamora Osorio, EPSO-UMH

Dr. Francisco Rodríguez Díaz, U. de Almería

Dr. Antonio Rosal Raya, Universidad Pablo de Olavide

Dr. Francisco Rubio Muñoz, CEBAS-CSIC Murcia

Dr. José A. Sánchez Zapata, EPSO-UMH

Dra. Laura Vázquez Araujo, Basque Culinary Center

Dr. Manuel Viuda Martos, EPSO-UMH

Dr. Lorenzo Ángel Zacarías García, IATA Valencia

COMITÉ DE HONOR

Sr. Rector Magnífico de la Universidad Miguel Hernández de Elche, D. Juan José Ruiz Martínez

Sr. Director de la EPSO-UMH, D. Ricardo Abadía Sánchez

Sr. Vicerrector de Estudiantes y Coordinación de la UMH, D. José Juan López Espín

ÍNDICE

Página

Conferencia Inaugural Impacto de la fisiología de la poscosecha en la innovación agroalimentaria.
Juan Luis Valenzuela. 18

Sesión 1: Recursos Fitogenéticos, Mejora y Biotecnología en Producción Vegetal

COMUNICACIONES ORALES

Mejora de la micropropagación en variedades de albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) mediante Sistemas de Inmersión Temporal.
C. Pérez-Caselles, L. Burgos, V. Origüela y N. Alburquerque. 28

Efecto de la aplicación de ácido salicílico en precosecha sobre la calidad de pimiento verde en la recolección y conservación.
A. Rodríguez, A. Dobón-Suarez, M.E. García-Pastor, P.J. Zapata y M. Giménez. 34

Cultivo a media escala de líneas de tomate Muchamiel con resistencia a virus para su comercialización en Alicante.
P. Carbonell, J.A. Cabrera, J.F. Salinas, A. Grau, A. Alonso, J.J. Ruiz, S. García-Martínez. 44

Introducción del gen Ty-2 en el Programa de Mejora Genética de Variedades Tradicionales de Tomate del CIAGRO-UMH.
J.A. Cabrera, P. Carbonell, J.F. Salinas, A. Grau, A. Alonso, S. García-Martínez y J.J. Ruiz. 51

Seguimiento de tres ensayos de tomate Muchamiel con resistencia a virus en el término municipal de Mutxamel durante el ciclo de primavera-verano 2021.
S. García-Martínez, J.M. Sánchez, A. Gómez, F. Hernández, M. Juárez, P. Guirao, A.M. Ortega, L. Noguera, A. Alonso, J.J. Ruiz. 57

Efecto de nanotubos de carbono sobre diferentes combinaciones de citoquininas en la proliferación in vitro del portainjertos Garnem.
J. A. Medina, F. Hernández y A. Galindo. 66

PRESENTACIÓN EN PÓSTER

Diferencias en fenoles, flavonoides, flavonoles y actividad antioxidante totales entre 24 cultivares de tápenas de dos subespecies, spinosa y rupestris.
M. Grimalt, M.S. Almansa, S. García, F. Hernández, P. Legua y A. Amorós. 76







Sesión 2: Horticultura, Citricultura, Fruticultura, Viticultura y Protección de Cultivos

COMUNICACIONES ORALES

Influencia del envejecimiento sobre la composición volátil y sensorial del vino tinto.
I. González-Sánchez, F. Burló y L. Noguera-Artiaga. 84

Efecto del aclareo y del dióxido de azufre sobre la calidad del vino tinto.
A. Grao-Ruiz, P. J. Zapata y L. Noguera-Artiaga. 94

Influencia de las propiedades del suelo en mostos de la variedad Monastrell en la Comarca del Noroeste-Región de Murcia.
M.A. Martínez, N. Martí, E. Martínez-Sabater y C. Paredes. 104

Efecto del tratamiento de limoneros con melatonina sobre la producción y calidad del fruto.
F. Badiche, M. Serrano, J.M. Valverde, A. Carrión-Antolí, D. Martínez-Romero, D. Valero, S. Castillo. 114

Los tratamientos con melatonina de cerezos 'Sweet Heart' aumentan el rendimiento del cultivo y la calidad del fruto en la recolección y durante la conservación.
M.V. Arias A.Carrión, F. Garrido, J.M. Lorente, P.J. Zapata, D. Valero, M. Serrano. 123

La aplicación precosecha de jasmonato de metilo incrementa el rendimiento y la calidad del cultivo de pimiento verde.
A. Dobón-Suárez, M.J. Giménez, M.E. García-Pastor y P.J. Zapata. 133

Caracterización temporal del limón mediterráneo para su aprovechamiento en la industria del zumo.
M.J. Rubio-Martínez, M.J. Giménez, M.E. García-Pastor, V. Serna-Escolano y P.J. Zapata. 144

Sesión 3: Economía Agraria y Gestión de Empresas

COMUNICACIONES ORALES

Estudio a consumidores sobre la aceptación de carne de cordero trashumante.
A. Ros Almela, N. Godoy Morales y L. Martínez-Carrasco Martínez. 154

Black soldier fly (Hermetia illucens) breeding and processing company in Aranda de Duero (Burgos).
P. Saiz Valle, I. Blanco-Gutiérrez, L. Luna. 162

Aspectos valorados por los consumidores a la hora de comprar o consumir ensaladas de IV gama.
J.M. Lorente, M. Serrano y M.T. Pretel. 171

Sesión 4: Producción, Bienestar, Genética y Calidad en la Producción Animal.

COMUNICACIONES ORALES

Crioconservación de dos líneas de conejos seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada.
B. Ruiz, M.L. García y M.J. Argente. 180

Conductas individuales y expresiones faciales en ovinos estabulados criados libres de parásitos gastrointestinales.
A.A. Luna Bojórquez, P.G. González Pech, F.A. Méndez Ortíz, C.A. Sandoval Castro, J.F.J. y Torres Acosta. 186

Estudio del porcentaje de inclusión de subproducto de alcachofa (brácteas) en dietas de cabras lecheras para una producción sostenible y circular.
P. Monllor, R. Muelas, A. Roca, E. Sendra, J.R. Díaz y G. Romero. 195



Sesión 5: Agricultura Sostenible. Cambio Climático y Estreses Ambientales.

COMUNICACIONES ORALES

Optimización de un método para evaluar la capacidad antifúngica de extractos de cianobacterias.
M.P. Marí, A.D. Asencio, M.T. Pretel y G. Díaz. 207

Mejora de la sostenibilidad del cultivo de fresa: mecanismos fisiológicos desencadenados por bacterias PGP bajo condiciones subóptimas de fertilización.
E. Romano, J.V. García López, N.J. Flores-Duarte, S. Merino, J. Mesa-Marín, I.D. Rodríguez-Llorente, S. Redondo-Gómez, E. Pajuelo y E. Mateos-Naranjo. 216

Estudio de caracterización de suelos contaminados con ceniza volcánica y forraje destinado a consumo animal en la zona de Bilbao-Ecuador.
L. Carrera-Beltrán, I. Gavilanes-Terán, J. Idrovo-Novillo, V. H. Valverde, T. Albán-Guerrero, S. Ruiz- Illapa, C. Paredes y A.A. Carbonell-Barrachina. 226

Influencia de la micorrización con Glomus sp. sobre sustancias farmacológicamente activas en el cultivo de Cistus albidus
L.D. Raus de Baviera, E. M. Losada-Echeberría, F. J. Álvarez-Martínez, F. Borrás-Rocher, E. Barrajón-Catalán y A. Ruiz Canales. 237

Especies de Variovorax asociadas al nódulo que mejoran el crecimiento y la nodulación de Medicago sativa en situaciones de estrés.
N.J. Flores-Duarte, J. Pérez-Pérez, E. Mateos-Naranjo, S. Redondo-Gómez, E. Pajuelo, I.D. Rodríguez-Llorente y S. Navarro-Torre. 247

Aplicaciones con poliaminas en floración y durante el desarrollo en el árbol reducen fisiopatías e incrementan la calidad de cereza (Prunus avium L.) de la IGP montaña de Alicante.
M. Nicolás, M.C. Ruiz-Aracil, A. Carrión-Antolí, J.M. Lorente-Mento, J.M. Valverde y F. Guillén. 257

Climate change, food crisis, Covid-19 in Mozambique.
Jérôme Etsong Mbang. 263

PRESENTACIÓN EN PÓSTER

Efecto de la aplicación de biofertilizantes basados en hongos micorrícicos y Trichoderma harzianum en el desarrollo de plantas de puerro.
G. Díaz, V. Fernández y P. Torres 268

Sesión 6: Gestión y Valorización de Residuos Orgánicos en la Agricultura.

COMUNICACIONES ORALES

Efectos del tipo de estiércol en la evolución de su co-compostaje con residuos vegetales y en la calidad agronómica del compost obtenido.
C. Santiago-Cubas y C. Paredes. 279

Aplicación agronómica de los digeridos procedentes de residuos de frutas y verduras.
C. Álvarez, M.P. Bernal y R. Clemente. 288

Importancia del manejo de pilas de compostaje en la evolución y calidad del compost en Lliria (Valencia)
I.O. Medina Benavides, M.T. Fernández Suarez, A. Pérez Espinosa, M.D. Pérez Murcia y R. Moral. 298

Caracterización de residuos orgánicos agrícolas y ganaderos generados en la provincia de Chimborazo (Ecuador) para el estudio de alternativas a su gestión actual.
V.H. Valverde, I. Gavilanes-Terán, J. Idrovo-Novillo, L. Carrera-Beltrán, S. Buri Tanguila, K. Salazar García y C. Paredes. 309

Combined effect on substrate, plastic biofilm and earthworms (Eisenia fetida) in presence of different type of plastic material under vermicomposting.
Z. Emil Blesa, Marcela Pedraza-Torres, J.A. Sáez, J.C. Sánchez-Hernández y R. Moral. 321

Efecto sobre la calidad del fruto del naranjo Navel v. Chislett Summer empleando varias opciones de manejo agronómico en una finca del sureste español.
S. Sánchez Méndez, E. Martínez Sabater, A. Pérez Espinosa, J. Sáez Tovar y R. Moral. 334

Presencia de plaguicidas en mezclas iniciales y compost maduros de productores agroecológicos. El rol del compostaje en su eliminación.
A. García-Rández, M.T. Fernández-Suárez, M.D. Pérez-Murcia y R. Moral. 341



PRESENTACIÓN EN PÓSTER

Valorización de residuos de la industria agroalimentaria mediante compostaje.
C.Álvarez, M.D. Pérez-Murcia, R. Moral, J.A. Pascual, M. Ros, C. Egea-Gilabert, J.A. Fernández y M.A. Bustamante. 351

Sesión 7: Instalaciones Industriales y Agrícolas.

COMUNICACIONES ORALES

Diseño de un velocímetro de banda de rodadura para ensayo de velocidad máxima en ciclomotor de 2 ruedas (L1/L1e) en condiciones estáticas.
M.M. Paricio-Caño y M. Ferrández-Villena. 361

PRESENTACIÓN EN PÓSTER

Empleo de nariz, lengua y ojo electrónicos de bajo coste para el monitoreo de procesos agroalimentarios.
M. Fernández, M. Ferrández-Villena, M. Oates, C. Molina, A. Conesa, J. Ramos, N. Abu Khalaf y A. Ruiz Canales. 373

Empleo de nariz electrónica de bajo coste en el monitoreo de colmenas de abejas.
E.González, M.A. Madueño y A. Ruiz Canales. 382

Sesión 8: Gestión del Agua, Nutrición y Energía en Horticultura.

COMUNICACIONES ORALES

Estimación de la huella de carbono: caso práctico en diez Comunidades de Regantes. Estrategias para su reducción.
S. Colino Jiménez, A. Melián Navarro y A. Ruiz Canales. 392

Obtención automática del punto de capacidad de campo a través de sensores de humedad de suelo.
M. Soler-Méndez, D. Parras-Burgos, A. Cisterne-López, E. Mas-Espinosa, J.M. Molina-Martínez y D. Intrigliolo. 403

Aplicaciones de teledetección para la mejora del riego de granado en la Vega Baja del Segura (Alicante, España).
J. Solano-Jimenez, S. Rodriguez-Cámara, H. Puerto-Molina y J.M. Cámara-Zapata. 411

PRESENTACIÓN EN PÓSTER

Determinación de la variación de la huella hídrica y la huella de carbono en una comunidad de regantes como medida de la mejora medioambiental de las instalaciones. Aplicación a un caso de estudio.
F. López Peñalver, J. Chazarra Zapata, A. Melián Navarro y A. Ruiz Canales. 420

Sesión 9: Usos del Territorio. Valoración de Recursos Agrarios. Desarrollo Rural.

COMUNICACIONES ORALES

Diversidad social y agroambiental en los paisajes mediterráneos costeros: el ENP La Muela y Cabo Tiñoso (Cartagena – Murcia).
J. Martínez Sánchez y L. Martínez-Carrasco Martínez. 432

PRESENTACIÓN EN PÓSTER

Desarrollo territorial en las marismas de la margen izquierda del Guadalquivir. .
M. A. Falcón Sánchez. 444

Sesión 10: Procesado e Innovación en Productos de Origen Animal.

COMUNICACIONES ORALES

Reformulación de hamburguesas de ternera con geles de emulsiones de agua y aceites vegetales.
A. Gea-Quesada, E. Sayas-Barberá, C. Botella-Martínez y M. Viuda-Martos. 452

Aplicación de un subproducto de mango como antioxidante en un producto cárnico.
LMorocho, F. Reyes, M.C. Guamán-Balcázar. 464

Caracterización de queso curado de oveja con y sin DOP Manchego basado en el perfil de compuestos volátiles, pH, humedad y ATR-FTIR.
R. Pesci de Almeida, K. A. Igler, M. Cano-Lamadrid, E. Sendra, A. Beltrán y A. Valdés. 472

Reducción parcial de sal y grasa en salchichas tipo Frankfurt con adición de harinas de Agaricus bisporus y Pleurotus ostreatus.
M.I. Cerón-Guevara, E. Rangel-Vargas, J.M. Lorenzo, R. Bermúdez, M. Pateiro, J.A. Rodríguez, I. Sánchez-Ortega y E.M. Santos. 481

PRESENTACIÓN EN PÓSTER

Modificación del perfil lipídico en salchichas tipo Frankfurt mediante una emulsión gelificada a base de trigo sarraceno y aceite de cáñamo.
C. Botella-Martínez, J. Fernández-López, J.A. Pérez-Álvarez y M. Viuda-Martos. 491

Sesión 11: Postcosecha y procesado de productos vegetales.

COMUNICACIONES ORALES

Efectos del tratamiento en precosecha con melatonina sobre los parámetros de calidad en granada 'Mollar de Elche'.
F. Garrido, J.M. Lorente-Mento, D. Valero y M. Serrano. 504

Proteína PeAfpA: optimización de su producción biotecnológica y aplicación en patosistemas postcosecha.
C. Ropero, J.F. Marcos y P. Manzanares. 514

Aplicación de GABA y 1-MCP: efecto sobre el almacenamiento refrigerado de tomate (Solanum lycopersicum L.).
E. Bernabé-García, M.C. Ruiz-Aracil, F. Guillén y J.M. Valverde. 524

Aplicación de tratamientos post-cosecha para incrementar la calidad durante el almacenamiento de aguacate (Persea americana M.).
M.I. Madalina-Ilea, M.C. Ruiz-Aracil, J.M. Valverde, M. Nicolás y F. Guillén. 533

Aprovechamiento de un subproducto de la industria de aceituna para el desarrollo de alimentos con un valor añadido.
M. Ródenas, M.J. Giménez, M.E. García-Pastor y P.J. Zapata. 543

Mejora de la conservación de la granada “Mollar de Elche” mediante tratamientos precosecha con Jasmonato de Metilo.
A.M. Codes-Alcaraz, A. Dobón-Suárez, M.E. García-Pastor y S. Castillo. 553

Efecto de la aplicación postcosecha de nitroprusiato de sodio sobre la calidad de limón ecológico.
A. Del Cerro, A. Dobón-Suarez, M.E. García-Pastor, M. Giménez y P.J. Zapata. 563

Melatonina aplicada como tratamiento en campo incrementa los sistemas antioxidantes en las cerezas ‘Prime Giant’.
A. Carrión-Antolí, F. Badiche, J.M. Lorente-Mento, F. Guillén, S. Castillo, M. Serrano y D. Valero. 573

Estudio del contenido en polifenoles de cuatro variedades de alcachofa (Cynara scolymus L.): aptitud para cuarta gama.
M. Giménez-Berenguer, M. J. Giménez, P. Carbonell, J. A. Cabrera y P. J. Zapata. 579

Sesión 12: Alimentación Funcional, Calidad Sensorial y Salud.

COMUNICACIONES ORALES

Esteroles vegetales en matrices líquidas: obtención e incorporación en una bebida de frutas.
M. Álvarez-Henao, J. Londoño-Londoño y C. Jiménez-Cartagena. 590

Microencapsulación de L. Plantarum en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica.
E. López-Martínez, M.J. Frutos y E. Valero-Cases. 601

Estudio del grado de implementación de Clean Label en alimentos de gran consumo en España: propuestas de mejora.
N. Jiménez-Redondo, M. Cano-Lamadrid y J. M. Valverde. 612

Elaboración de cerveza artesana sin alcohol enriquecida funcionalmente con brotes de brócoli ecológico.
J. Gerth, A. Dobón-Suarez, M.E. García-Pastor, M. Giménez y P.J. Zapata. 621







PRESENTACIÓN EN PÓSTER

Alteración de la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19.
P. Bersano-Reyes y G. Nieto-Martínez. 630

Caracterización de compuestos bioactivos de las semillas de dos cultivares de Opuntia ficus-indica (L.) Mill. en condiciones homogéneas de cultivo.
L. Andreu-Coll, J. Kolniak-Ostek, A. Kita, J. Miedzianka, P. Legua y F. Hernández. 636

Índice de autores 646

CONFERENCIA INAUGURAL: IMPACTO DE LA FISIOLOGÍA DE LA POSCOSECHAEN LA INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA

Juan Luis Valenzuela

Impacto de la fisiología de la poscosecha en la innovación agroalimentaria

Juan Luis Valenzuela.

Dpto. Biología & Geología, Escuela Superior de Ingeniería, Universidad de Almería, Camino Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería. jvalenzu@ual.es

Resumen

El cada vez mayor y mejor conocimiento de la fisiología de la poscosecha ha permitido mantener la calidad de los productos hortofrutícolas, reducir las pérdidas poscosecha y prolongar la vida útil de los productos, entre otros aspectos. En un mundo cada vez más globalizado y con una dependencia de los mercados y de los consumidores, la industria agroalimentaria en general y la producción y comercialización hortofrutícola en particular, dependen cada vez más de innovaciones que permitan presentar productos que respondan a las exigencias de los comercios. Estas innovaciones, basadas fundamentalmente en el manejo y control de las funciones fisiológicas, permiten a las empresas y actores de la industria agroalimentaria responder a las demandas que los mercados. Algunas de estas innovaciones se basan, por ejemplo, en el control de la acción del etileno y así hoy en día es usual el empleo de bloqueantes de la acción del etileno para retrasar la maduración de frutos. O bien manejar las actividades enzimáticas para evitar pardeamientos en productos procesados de aguacate o controlar los procesos respiratorios que permitan eliminar la astringencia en caqui. En definitiva, la mayoría de las innovaciones de productos hortofrutícolas que aparecen en el mercado están basadas en la fisiología de la poscosecha, unas innovaciones actúan directamente en el control de una determinada función fisiológica, y otras innovaciones, modifican o alteran dichas funciones gracias a la mejora genética, a técnicas biotecnológicas o a técnicas de modificación genética.

Palabras clave: Conservación de frutos, Etileno, Fisiología de la poscosecha, Innovación, Nuevos productos. Perspectivas de futuro.

Impact of post-harvest physiology on agri-food innovation

Abstract

Increasing and better knowledge of postharvest physiology has made it possible to maintain the quality of fruit and vegetable products, reduce postharvest losses and, extend the shelf life of products. In a world where globalisation in constantly increasing, the agri-food industry in general and fruit and vegetable production and marketing in particular, are more and more dependent on innovations that make it possible to present products that meet the demands of the trade. These innovations, mainly based on the management and control of physiological functions, enable companies and partners in the agri-food industry to respond to market requirements. Some of these innovations are based, for example, on the control of ethylene action, and it is now common to use ethylene blockers to delay fruit ripening. Or managing enzymatic activities to avoid browning in processed avocado products or controlling respiratory processes to eliminate astringency in persimmon. In short, most of the fruit and vegetable product innovations appearing on the market are based on postharvest physiology, some innovations acting directly on the control of a certain physiological function, and other innovations, modifying or altering these functions thanks to genetic improvement, biotechnological techniques, or genetic modification techniques.

Keywords: Fruit preservation, Ethylene, Postharvest physiology, Innovation, New products. Future perspectives.

Introducción

La fisiología de la poscosecha es una rama de la fisiología vegetal que estudia los procesos y funciones que tienen lugar en las estructuras y órganos vegetales tras su cosecha. Sin embargo, estas estructuras y órganos presentan la particularidad de que están separados de la planta madre y están abocados al deterioro y a la muerte (Pareek, 2016). En definitiva, la fisiología de la poscosecha estudia la respuesta de las plantas a las tecnologías, aplicaciones y tratamientos que buscan prolongar la vida útil de los productos agrícolas, mantener la calidad de éstos y retrasar su senescencia y muerte. Si hemos definido fisiología de la poscosecha, hemos de definir poscosecha. Poscosecha es el periodo de tiempo que transcurre desde que una estructura u órgano es recolectado hasta que es consumido por el consumidor final. En este sentido, se ha de tener presente que el consumidor final va a depender del tipo de producto agrícola y del fin a que esté destinado ese producto agrícola. Por ejemplo, consumidor final es tanto una industria que se dedica al envasado de tomate triturado, como el ciudadano de a pie que compra tomate en fresco. Ambos en este caso, son consumidores finalistas y las características de calidad, fisiológicas y, en definitiva, las características poscosecha de los dos tipos de tomate pueden y deben ser muy diferentes (Heuvelink, 2018). En resumidas cuentas, las características poscosecha de los productos hortofrutícolas van a depender de una serie de factores, muchos de ellos ajenos al producto hortofrutícola, mientras que otros son intrínsecos y caen dentro del ámbito de la fisiología o de las características anatómicas, por ejemplo. Es indudable que el consumidor final es uno de esos factores, y posiblemente el más influyente debido a sus exigencias sobre calidad, presentación y demanda de un determinado producto en una determinada fecha. Es el consumidor final, sea cual sea dicho consumidor, quien dicta las normas del mercado en el que los diferentes productos hortofrutícolas han de competir. Es en esta competición donde la innovación toma energía y se alimenta para ofrecer los productos con las características demandadas. Productos, por ejemplo, más resistentes al transporte, o que puedan resistir temperaturas de conservación más bajas y durante más tiempo, productos que tenga una maduración retardada, o unas características organolépticas mejoradas y determinadas. En todos estos ejemplos se va a poder encontrar una base fisiológica que, una vez conocida, modificada y manejada adecuadamente permite responder a la demanda del mercado. Siempre que los consumidores sigan incrementando el consumo de frutas y verduras, la presión por ofrecer productos de alta calidad, con una mayor vida útil y con una producción, transporte y comercialización respetuosa con el medio ambiente será cada vez mayor.

Innovación puede definirse como cualquier cambio de significativa novedad con un impacto de valor para los agentes implicados (Dellepiane, 2014). En esta definición es importante tener en cuenta dos aspectos: "*novedad significativa*", es decir el cambio ha de ser elocuente, tiene que aportar algo sustancialmente distinto a lo que había antes. Y debe ofrecer un *"resultado apreciable"* es decir la idea ha de ser llevada a la práctica, debe tener un impacto y mejorar el producto. Dicho en otras palabras, se debe *"percibir el valor"*, se debe traducir en valor para alguien y que sea percibido por el colectivo beneficiario (Dellepiane, 2014).

La relación entre la fisiología de la poscosecha y la innovación nació de manera natural al cubrir la necesidad de ofrecer productos hortofrutícolas frescos durante más tiempo y a una población mayor. Así una de las primeras "innovaciones" fue retrasar el deterioro de los productos recolectados al ralentizar su metabolismo, protegiéndolo de temperaturas elevadas y manteniéndolo en refrigeración.

En esta conferencia vamos a presentar como a través del conocimiento de la fisiología de la poscosecha se tienen en el mercado innovaciones que aportan un valor apreciable y son novedades significativas.

Relación entre la fisiología de la poscosecha, la calidad y la innovación.

Es el deterioro de los productos frescos y la necesidad de ampliar su vida útil la base de la relación entre la fisiología de la poscosecha y la innovación. Superada esta necesidad surge otra: ofrecer productos de calidad y productos con la calidad demandada por el mercado. En esta relación tan estrecha hay una serie de fuerzas impulsoras que son las que determinan, primero la necesidad de innovar y, segundo la orientación hacia donde se han de dirigir las innovaciones. Estas fuerzas impulsoras son múltiples y diversas y entre otras se encuentran las propias demandas de los agricultores, los nuevos mercados, las demandas de los consumidores, el concepto de calidad, el I+D+i, el márketing y las normativas gubernamentales, entre otras. Pero estas fuerzas no son estáticas sino dinámicas y cambiantes lo que supone un reto más en la innovación. Así el concepto de calidad. es variable, pues si hace unos años atrás se asociaba calidad de un producto con su calidad externa, hoy en día la calidad pasa por una calidad sanitaria, nutricional y con la producción sostenible de los productos hortofrutícolas. Sirva de ejemplo de la actuación de estas fuerzas, el tomate larga vida que, en su día, hace ya más de 30 años, respondió a la necesidad de alargar la vida poscosecha de los frutos, lo que permitió alcanzar mercados más lejanos. Y respondió a estas demandas al retrasar el ablandamiento del fruto (Casals et al, 2012), pero a la vez satisfizo a los agricultores ya que la planta de tomate era robusta y productiva. En el tomate LSL (*Long Self, Life*) se logró retrasar la maduración y el ablandamiento gracias a la investigación y desarrollo, al ofrecer una planta que lleva en heterocigosis genes que inhiben el proceso de maduración y por ende los procesos de ablandamiento que la maduración conlleva (Mutschler et al., 1992). Éste no es sino un simple ejemplo donde el conocimiento de los actores implicados en la maduración permitió su manejo y ofrecer un "nuevo producto". Pero debido al dinamismo de las fuerzas impulsoras, hoy en día la innovación en tomate pasa por el incremento en aspectos nutricionales, de sabor, amen de estéticos como es el caso del tomate *"yoom"* de alto contenido en antioxidantes, manteniendo una firmeza y textura crujiente.

Por tanto, entre el productor y el consumidor, siempre hay un testigo que se entrega y que estará matizado por las diferentes innovaciones basadas en el manejo de la fisiología de la poscosecha. Y así muchas de las innovaciones que han aparecido y aparecerán están basadas en el control del etileno, como en el ejemplo del tomate LSL. Otras se basan en controlar los procesos respiratorios o de transpiración, como ocurre con los recubrimientos comestibles. Otras innovaciones se decantan por controlar actividades enzimáticas y así aparecen diferentes tecnologías que ayudan a retrasar o evitar el pardeamiento de frutos, tecnologías especialmente útiles en los productos mínimamente procesados en fresco y en la oferta de productos frescos procesados. Otras innovaciones van destinadas a mejorar aspectos organolépticos al manejar de alguna manera la composición química de frutas y verduras, por ejemplo, al incrementar el contenido de antocianos en tomate o reducción de astringencia en caqui. Otras innovaciones se aprecian en tecnologías que, basadas en la fisiología, ofrecen productos procesados, como cremas, salsas, donde el pardeamiento es controlado y la textura del producto puede mantenerse durante bastante tiempo.

Innovaciones por manejo y control del etileno.

El etileno participa en numerosos procesos fisiológicos y su control es fundamental para mantener y mejorar la calidad de los productos agrícolas. Aplicaciones de etileno son habituales en la desverdización de cítricos, siendo uno de los ejemplos clásicos en los que el manejo del etileno consiste en su aplicación. Más habitual en el manejo del etileno es controlar o limitar su producción para así mitigar o evitar sus efectos, fundamentalmente en la maduración de frutos. Los tratamientos cuyo fin es el control del etileno suelen aplicarse en poscosecha, siendo muy pocos los aplicados en

precosecha. Algunos compuestos como Daminozida y Aminoetoxi-vinil-glicina (AVG) son aplicados en precosecha y buscan controlar la producción de etileno (Tang et al., 2018). Daminozida retrasa la producción autcatalítica de etileno y AVG inhibe la actividad de la ACCsintasa, ambos compuestos autorizados en la producción de ornamentales producen plantas más compactas, regulan la floración y retrasan el crecimiento. Aunque hay otros efectos, como por ejemplo en la coloración de las flores. La aplicación de Daminozida en peonía produce flores con una menor coloración ya que este compuesto induce una menor expresión de genes relacionados con la síntesis de flavonoides (Tang et al., 2018)

El control poscosecha del etileno tiene dos vertientes: una de ellas consiste en retirar el etileno del ambiente, la otra vertiente es impedir su acción. En cualquier caso, se busca retrasar la maduración de los frutos. Para retirar el etileno del ambiente se emplean los adsorbentes de etileno, que generalmente están compuestos por una arcilla tipo sepiolita o clinoptilolita, carbón activo (aunque no está presente en todos los formulados) y permanganato potásico. Los diferentes formulados suelen tener una presentación granular y están envueltos en papel permeable al etileno. Todos estos adsorbentes de etileno se basan en una arcilla que adsorbe el etileno que a su vez es oxidado por el permanganato potásico y de esta forma es retirado el etileno del ambiente (Álvarez-Hernández et al., 2019). Otros adsorbentes de etileno no utilizan permanganato potásico en su composición sino metales como paladio o platino que provocan la oxidación catalítica del etileno. La presentación de estos adsorbentes de paladio o platino puede ser muy diversa, pero en general es una presentación en forma de láminas o etiquetas de diverso tamaño que se colocan junto a los frutos (Elmi, et al., 2012).

Quizá la más llamativa de las innovaciones en cuanto al control del etileno en poscosecha sea las aplicaciones de 1 metil-ciclopropeno (1MCP) (Blankenship y Dole, 2003). En este caso el control no está basado en controlar la producción de etileno o en retirarlo del ambiente, sino en evitar su acción. Para ello la molécula de 1MCP ocupa irreversiblemente el lugar del etileno en los receptores del etileno interfiriendo, por tanto, desde el inicio la ruta de señalización de esta hormona que queda desactivada y el fruto se comporta como si se encontrara en un ambiente sin etileno. En pocas palabras la ruta de señalización queda resumida en el siguiente esbozo:

El etileno es percibido por una serie de receptores con un dominio quinasa y que tienen una alta afinidad por el etileno. Estos receptores son reguladores negativos de la señalización del etileno. Interactúan con otros receptores gracias al dominio GAF y esto puede explicar el amplio rango de sensibilidad al etileno existente en las plantas (0,2 nL/L a 1000 mL/L). El siguiente componente en la ruta es conocido como CTR1 y cuando está activo suprime la respuesta del etileno. El CTR1 interactúa con el siguiente componente de la ruta: el EIN2 que regula la disponibilidad de unos factores de transcripción que son los encargados de provocar la expresión de genes relacionados con la maduración y la senescencia (Ju y Chang, 2015). En ausencia de etileno, los receptores activan al CTR1 que al fosforilar el extremo C-terminal del EIN2, lo inactiva. En estas condiciones los factores de transcripción son degradados por el proteosoma 26S y los genes relacionados con la respuesta al etileno no se transcriben. Cuando hay etileno en el ambiente, los receptores se inactivan. El CTR1 no fosforila al EIN2 y el extremo C-terminal del EIN2 se escinde y viaja al núcleo donde estabiliza a los factores de transcripción y se activa la transcripción de los genes de respuesta al etileno (Cara y Giovannoni, 2008; Ju y Chang, 2015).

El 1MCP es un gas que ocupa el lugar del etileno en los receptores, impidiendo que se produzca toda la cascada de eventos de la ruta de señalización y, por tanto, no se expresan los genes relacionados con los fenómenos fisiológicos en los que está implicado el etileno. La aplicación de 1MCP se lleva a cabo por técnicos especialistas, que deciden en qué estado de madurez deben encontrarse los frutos para que le tratamiento sea efectivo, también deciden la concentración y duración del tratamiento. En frutos climatéricos suele aplicarse en el mínimo preclimatérico, cuando la producción de etileno en el fruto es muy baja y los receptores de etileno aún no han sido ocupados por éste.

Innovaciones en la reducción del pardeamiento.

El pardeamiento de los frutos al cortarse y exponerse al aire es uno de los fenómenos fisiológicos más conocidos. Debido a la acción de enzimas como la polifenoloxidasa que oxida a los fenoles de los frutos produciendo coloraciones pardas. Dado que el contenido en fenoles en los frutos es alto, más en frutos inmaduros que en frutos maduros, el pardeamiento es un fenómeno muy común que deteriora el aspecto e incluso el sabor de los frutos. Uno de lo fenoles más abundantes es el ácido clorogénico, éster del ácido caféico, ampliamente distribuido en todos los frutos y es el principal sustrato implicado en el pardeamiento enzimático cuando se corta el fruto y se expone al aire, siendo la polifenoloxidasa responsable de ese pardeamiento. De manera natural el control de la actividad de la PPO se realiza mediante la compartimentación de los sustratos. La enzima está en los cloroplastos y plastidios y los fenoles se encuentran en vesículas. Un daño mecánico (corte o golpe) rompe la compartimentación, poniendo en contacto al enzima y al sustrato (Sommano et al. 2020).

El control del pardeamiento enzimático en los frutos cortados pasa evitar el contacto con el oxígeno, o bien manteniendo un pH bajo en el cual la enzima presenta una actividad reducida. En este sentido, se emplean antioxidantes sintéticos o naturales para inhibir la oxidación y así limitar las pérdidas poscosecha y mantener la calidad. Se ha estudiado extensamente el uso de materiales naturales y biodegradables capaces de formar una película o un recubrimiento comestible para aislar y proteger de la oxidación a la fruta cortada, además estos recubrimientos también protegen de la deshidratación y pérdida de agua.

Una de las innovaciones que más éxito ha tenido son los tratamientos con alta presión hidrostática, HPP (*High Pressure, Processing*). Esta tecnología que se emplea tanto en productos de origen animal como vegetal consiste en aplicar presiones de hasta 600 Mpa durante unos minutos. La presión es transmitida por el agua de manera uniforme e instantánea a todos los puntos del producto. Además del efecto de inactivación enzimática (caso de PPO y otras), también se consigue una reducción de patógenos. Actualmente es una tecnología muy utilizada en la conservación de cremas, sopas frías y salsas, zumos de frutas, etc. dando unos resultados excelentes. El efecto que la presión hidrostática consigue es similar al de una pasteurización, pero sin usar altas temperaturas (Abera, 2019) y la tecnología también es conocida como pascalización.

Las técnicas de transgénesis nos aportan innovaciones interesantes en productos muy comunes. Así la manzana Artic® presenta silenciado el gen del PPO, por lo que al cortarla no se pone de color pardo, siendo muy útil para su comercialización como fruta cortada en gajos, listos para comer (Stowe y Dhingra, 2021). En patata, se han introducido genes de una patata silvestre latinoamericana y ha conferido unos interesantes resultados en la patata conocida como Innate®, así es más resistente a *Phytophthora infestans* y a pardeamiento y a daños mecánicos, así como. Muy interesante el hecho de que su menor contenido en asparagina, provoca una menor cantidad de acrilamida cuando se fríe. La acrilamida está considerada como un cancerígeno por lo que es otra cualidad interesante la que presenta esta innovación (Ghislain y Douches, 2020).

Innovaciones: Recubrimientos comestibles.

Por añadidura no solo se emplean en los productos mínimamente procesados, sino que también se emplean en producto entero. El recubrimiento comestible de frutos ofrece los beneficios antes comentados, pero además una reducción de materiales de empacado y suponen una barrera física en la piel de los frutos reduciendo la permeabilidad al O_2, al CO_2 y al vapor de agua, lo que conlleva una reducción de los procesos respiratorios y de la transpiración y un retardo en la maduración (Díaz-Mula et al., 2012). Entre los recubrimientos más investigados se encuentra el alginato sódico que se ha empleado como recubrimiento en cerezas donde aporta como beneficios el retraso en los cambios de coloración, menor acidez y mayor firmeza en los frutos tratados, así como una menor tasa respiratoria y el mantenimiento durante más tiempo de la actividad antioxidante total. Los ensayos indican que

puede doblarse la vida útil de la cereza con el recubrimiento de alginato (Díaz-Mula et al., 2012). En tomate el recubrimiento de alginato ofrece unos resultados similares, así como cuando el fruto se recubre con zeína. Tanto en cerezas como en tomate se observa una menor tasa respiratoria y una menor producción de etileno que se correlaciona con el retraso en la maduración. (Zapata et al. 2008). Otros recubrimientos se basan en geles de aloe, tanto de *Aloe vera* como *A. arborescens* siendo ambos de similar eficacia cuando se han empleado en melocotón y ciruela. (Guillén et al., 2013).

Innovaciones: aceites esenciales.

El empleo de aceites esenciales como agente que mejore la poscosecha de los frutos y reduzca su deterioro se basa en su poder antimicrobiano. Sin embargo, se ha encontrado que su aplicación induce a una menor producción de etileno, por lo que aquí puede encontrarse parte del efecto que su aplicación tiene sobre la mejora de la poscosecha de frutos. Los aceites esenciales más utilizados son el timol, el eugenol, el eucaliptol, el mentol y el carvacrol, que se incorporan al envase mediante la incorporación directa en una pequeña gasa. A continuación, el envase se cierra inmediatamente de forma hermética para minimizar la vaporización. Este método ha sido ampliamente utilizado en varios estudios, generalmente en combinación con el envasado en atmósfera modificada (MAP) (Serrano et al., 2008). Aunque la mayoría de los estudios tienen como objetivo reducir las pérdidas causadas por el deterioro fúngico y microbiano, la aplicación de aceite esencial interfiere con la maduración de los frutos. La razón del retraso en la maduración no es del todo conocida, pero todo indica que los aceites esenciales interfieren con el etileno. De hecho, es común una menor producción de etileno cuando los frutos se encuentran ante una atmósfera con aceite esencial. Las formas de aplicación del aceite esencial pasan por agregarlo en una gasa o bien aditivar el plástico del contenedor con aceite esencial, o integrarlo en microcápsulas. Sin embargo, es posible implementar el uso de aceite esencial si se emplean las partes de la planta que produce el aceite esencial. Así Duque et al. en 2021, proponen el uso de una mezcla de clinoptilolita, carbón activo y clavo molido que se incorpora en forma de "sachet" en el interior del contenedor. Los resultados indican que en tomate hay un notable retraso en la maduración de los frutos de tomate que se asocia con una menor producción de etileno. Los resultados son similares a cuando en el contenedor se introduce un adsorbente de etileno a base de permanganato.

Innovación en caqui: eliminación de la astringencia.

Una de las variedades más reconocidas de caqui es la Rojo Brillante. Esta variedad es astringente ya que presenta un alto contenido en taninos solubles que deben transformarse en insolubles en la madurez para que este fruto pueda consumirse. En estado maduro, el caqui rojo brillante es un fruto muy dulce y agradable de comer, pero a la vez es muy blando, y por tanto no apto para resistir cualquier proceso de poscosecha como manipulación, empacado, transporte, comercialización, etc. De manera natural, durante la maduración los taninos solubles se insolubilizan perdiendo así el fruto la astringencia. Un procedimiento desastringente consiste en someter a los frutos a una atmósfera de CO_2 y/o N_2 para interferir los procesos respiratorios. En estas condiciones se produce aldheído que insolubiliza los taninos, agregándolos y uniéndolos. De esta manera el caqui ya puede consumirse, pierde su astringencia, pero mantiene su firmeza y crujientez, permitiendo una comercialización que de otra manera no sería posible. Estos tratamientos con CO_2 han supuesto una revolución en la comercialización del caqui y así hoy en día es habitual encontrarlos en el mercado como si de una fruta más se tratara. De hecho, ha habido una interesante innovación en marketing, ya que este caqui Rojo Brillante es comercialmente ahora conocido con la marca Persimon®, que ha obtenido además la calificación de Denominación de origen Protegida "Ribera del Xuquer". Podría decirse en realidad que estamos ante un nuevo producto (Arnal y Del Río, 2003; Fathi-Najafabadi, et al., 2021).

Daños por frío: Innovación

Los daños por frío son un desorden fisiológico debido a la exposición prolongada de los frutos a temperaturas inferiores a un mínimo crítico, pero superiores a su punto de congelación. Estos daños suponen una pérdida comercial importante. Las bajas temperaturas se asocian con la producción de especies reactivas de oxígeno que producen un estrés oxidativo (Valenzuela et al., 2017). Diferentes tipos de tratamientos tratan de limitar el estrés oxidativo, uno de los más eficaces es el recubrimiento con plástico retráctil del fruto. En calabacín se ha comprobado como este tratamiento reduce el estrés oxidativo, reduce la producción de peróxido de hidrógeno y de MDA y por ende los frutos de calabacín presentan un menor daño por frío (Megías et al. 2015).

Innovación en las propiedades nutracéuticas.

El consumidor dispone hoy en día de numerosa información que alerta del necesario consumo de frutas y hortalizas como método preventivo frente a enfermedades oncológicas y cardiovasculares. Del mismo modo, el consumidor actual es consciente de la importancia de la ingesta de compuestos antioxidantes para la prevención de diversas enfermedades (Martínez et al., 2021) En este sentido, aparecen en el mercado nuevas variedades de tomates, manzanas, zumos de granada y frutos rojos con implementación en el contenido de diversos antioxidantes. Nuevas variedades de frutos con un alto contenido en antocianinas se ven en el mercado cada vez con mayor frecuencia, nacidos de cruces y mejora genética y al ya conocido tomate *Kumato*®, se le unen otros frutos como las manzanas, *Redmoon*® (https://www.redmoon-apple.com/es/) o *Kissabel*® (https://www.kissabel.com/es/) con una amplia gama de variedades. O el interesante tomate *Yoom*® (https://www.yoomtomato.com/es) que, con un pequeño tamaño, un peculiar color y su textura crujiente y jugosa le convierten en un atractivo fruto que además contiene un alto porcentaje en antocianinas y carotenoides.

Retos y perspectivas:

La mayoría de las innovaciones que se han producido y producirán en la industria agroalimentaria se basan fundamentalmente en el conocimiento de la fisiología de la poscosecha. Este conocimiento permite manipular, corregir, intensificar, o corregir diferentes aspectos que conducirán a la obtención de nuevos productos y especialidades. La globalización es un factor incidente sobre las innovaciones, pues la necesidad de productos que satisfagan a un mercado cada vez más amplio supone un reto asumible y necesario. Productos que hoy en día son habituales, no podríamos encontrarlos en los mercados si la globalización no estuviera presente. Del mismo modo, la información disponible sobre la relación dieta-frutas-verduras-enfermedades hace que también el consumidor exija cada día productos agroalimentarios mas sanos y sostenibles. Todos estos factores implican que el mercado presione sobre la industria agroalimentaria y condicione el posicionamiento de las diferentes innovaciones que aparecen. Por otra parte, un mundo que se encamina hacia los 9.000 millones de habitantes no puede permitir las elevadas pérdidas poscosecha que se producen, por lo que aparecen políticas encaminadas a la reducción de las pérdidas y desperdicios en los alimentos. Aquí la innovación agroalimentaria tiene un vasto campo donde cualquier novedad encaminada a la reducción de pérdidas, o al aprovechamiento de residuos agrícolas será bienvenida.

Innovaciones sostenibles con el medio ambiente, tanto en producción como en poscosecha. Innovaciones destinadas a la reducción de materiales de empaque, especialmente plásticos y así evitar la proliferación de microplásticos. Innovaciones que permitan una mejora de las propiedades nutracéuticas. Nuevos productos y presentaciones que permitan afrontar con éxito la competitividad impuesta por un mercado globalizado son algunos de los retos que se tienen que afrontar.

Bibliografía

Abera, G. (2019). Review on high-pressure processing of foods. Cogent Food & Agriculture, 5 (1), 1568725.

Álvarez-Hernández, M. H., Martínez-Hernández, G. B., Avalos-Belmontes, F., Castillo-Campohermoso, M. A., Contreras-Esquivel, J. C., Artés-Hernández, F. (2019). Potassium permanganate-based ethylene scavengers for fresh horticultural produce as an active packaging. Food Engineering Reviews, 11 (3), 159-183.

Arnal, L., Del Río, M. A. (2003). Removing astringency by carbon dioxide and nitrogen−enriched atmospheres in persimmon fruit cv. "Rojo brillante". Journal of Food Science, 68(4), 1516-1518.

Blankenship, S. M., Dole, J. M. (2003). 1-Methylcyclopropene: a review. Postharvest Biology and Technology, 28 (1), 1-25.

Cara, B., Giovannoni, J. J. (2008). Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. Plant Science, 175 (1-2), 106-113.

Casals, J., Pascual, L., Cañizares, J., Cebolla-Cornejo, J., Casañas, F., Nuez, F. (2012). Genetic basis of long shelf life and variability into Penjar tomato. Genetic Resources and Crop Evolution, 59 (2), 219-229.

Dellepiane, R. R. (2014). Innovación en la industria agroalimentaria. Características y factores de éxito. Cuadernos de estudios agroalimentarios, (6), 83-100.

Díaz-Mula, H. M., Serrano, M., Valero, D. (2012). Alginate coatings preserve fruit quality and bioactive compounds during storage of sweet cherry fruit. Food and Bioprocess Technology, 5 (8), 2990-2997.

Duque, L. F., Amador, M. V., Guzmán, M., Asensio, C., Valenzuela, J. L. (2021). Development of a New essential oil-Based technology to maintain fruit quality in tomato. Horticulturae, 7(9), 303.

Elmi, F., Meyer, M.D. and Terry, L.A. (2012). Extension of avocado storability Using e+® ethylene remover coated sheets in sea containers. Acta Horticulturae, 945, 325-330.

Fathi-Najafabadi, A., Besada, C., Gil, R., Tormo, D., Navarro, P., Salvador, A. (2021). Application of a new wax containing ethanol as a method to remove persimmon astringency during cold storage. Journal of Food Science and Technology, 1-11.

Ghislain, M., Douches, D. S. (2020). The genes and genomes of the potato. In The Potato Crop pp. 139-162. Springer, Cham.

Guillén, F., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Valero, D., Serrano, M., Castillo, S., Martínez-Romero, D. (2013). *Aloe arborescens* and *Aloe vera* gels as coatings in delaying postharvest ripening in peach and plum fruit. Postharvest Biology and Technology, 83, 54-57.

Heuvelink, E. (2018). Tomatoes. 2nd ed. CABI, Boston, MA, USA.

Ju, C., Chang, C. (2015). Mechanistic insights in ethylene perception and signal transduction. Plant Physiology, 169 (1), 85-95.

Martínez, C., Valenzuela, J. L., Jamilena, M. (2021). Genetic and Pre-and Postharvest Factors Influencing the Content of Antioxidants in Cucurbit Crops. Antioxidants, 10 (6), 894.

Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., García, A., Rebolloso-Fuentes, M. D. M., Garrido, D., Valenzuela, J.L. Jamilena, M. (2015). Individual shrink wrapping of zucchini fruit improves postharvest chilling tolerance associated with a reduction in ethylene production and oxidative stress metabolites. PloS one, 10 (7), e0133058.

Mutschler, M. A., Wolfe, D. W., Cobb, E. D., Yourstone, K. S. (1992). Tomato fruit quality and shelf life in hybrids heterozygous for the alc ripening mutant. HortScience, 27 (4), 352-355.

Pareek, S. (2016). Postharvest ripening physiology of crops. CRC Press. Boca Raton, Fl. USA.

Serrano, M.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Valverde, J.M.; Zapata, P.; Castillo, S.; Valero, D. (2008) The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. Trends Food Sci. Technol. 219, 464–471.

Sommano, S. R., Chanasut, U., Kumpoun, W. (2020). Enzymatic browning and its amelioration in fresh-cut tropical fruits. In Fresh-Cut Fruits and Vegetables pp. 51-76. Academic Press.

Stowe, E., Dhingra, A. (2021). Development of the Arctic® Apple. Plant Breeding Reviews, 44, 273-296.

Tang, Y., Zhao, D., Tao, J. (2018). Daminozide reduces red color intensity in herbaceous peony (Pa*eonia lactiflora* Pall.) flowers by inhibiting the expression of flavonoid biosynthetic genes. 3 Biotech, 8 (2), 1-10.

Valenzuela, J. L., Manzano, S., Palma, F., Carvajal, F., Garrido, D., Jamilena, M. (2017). Oxidative stress associated with chilling injury in immature fruit: postharvest technological and biotechnological solutions. International Journal of Molecular Sciences, 18 (7), 1467.

Zapata, P. J., Guillén, F., Martínez−Romero, D., Castillo, S., Valero, D., Serrano, M. (2008). Use of alginate or zein as edible coatings to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill) quality. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88 (7), 1287-1293.

Sesión 1:

Recursos Fitogenéticos, Mejora y Biotecnología en Producción Vegetal

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Mejora de la micropropagación en variedades de albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) mediante Sistemas de Inmersión Temporal

C. Pérez-Caselles, L. Burgos, V. Origüela y N. Alburquerque

Grupo de Biotecnología de Frutales. Departamento de Mejora Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Campus de Espinardo, 30100. Murcia: cperez@cebas.csic.es

Resumen

El cultivo in vitro es una alternativa muy útil para la proliferación de especies con un bajo ratio de propagación y largos ciclos de vida. La producción de nuevos brotes mediante el cultivo in vitro (micropropagación) a partir de material vegetal de frutales de hueso es un método muy interesante para conseguir gran cantidad de material clonal en condiciones controladas y asépticas. En el caso del albaricoquero, aunque existen protocolos de micropropagación, es interesante la puesta a punto de un nuevo método que maximice la proliferación del material vegetal. Existen diferentes factores que influyen en la micropropagación del albaricoquero, como el genotipo, la edad del explanto, la fuente de azúcares, los reguladores del crecimiento o el sistema de cultivo. El medio semisólido, que incorpora agar en su composición, es el método más habitual para el cultivo in vitro de albaricoquero. Sin embargo, los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) son un método de cultivo efectivo para la producción de material vegetal a gran escala en medio líquido. El objetivo de este trabajo consiste en estudiar la micropropagación de las variedades 'Canino' y 'Mirlo Rojo' en biorreactores de inmersión temporal y su comparación frente al tradicional medio semisólido. Para ello se ha medido la tasa de proliferación (número de brotes nuevos / número de brotes iniciales), la longitud de los brotes, la productividad (el producto entre la tasa de proliferación y la longitud media de los brotes) y la superficie de la cuarta hoja del tallo principal del brote inicial. El cultivo en biorreactores ha mejorado la micropropagación de ambas variedades con respecto al cultivo en medio semisólido. La mejor productividad se ha obtenido en la variedad 'Canino', siendo de 6,34 en el SIT frente a 3,57 del medio semisólido. La mayor superficie de hoja se ha obtenido en la variedad 'Mirlo Rojo', siendo de 3,98 cm^2 para el cultivo en biorreactores frente a 1,68 cm^2 del cultivo en medio semisólido.

Palabras clave: cultivo in vitro, proliferación, medio semisólido, biorreactor.

Micropropagation protocol improvement of apricot tree cultivars (*Prunus armeniaca* L.) using Temporary Immersion Systems

Abstract

In vitro culture is an effective alternative for the proliferation of species with a low rate of propagation and long life cycles. Producing new fruit tree shoots through in vitro culture is an effective method to get a high amount of clonal material with controlled and aseptic conditions. Although apricot micropropagation protocols have been developed, it is interesting to obtain a new protocol for optimizing plant micropropagation. Different factors like genotype, shoot age, sugar source, plant growth regulators or culture system affect micropropagation. Agar semi-solid medium is the most used method for the apricot in vitro culture. Temporary Immersion Systems (TIS) are an effective culture system to produce large-scale plant material with liquid medium. This study aims to investigate the micropropagation of 'Canino' and 'Mirlo Rojo' cultivars in bioreactors and their comparison with traditional agar semi-solid medium. With this purpose, proliferation rate (new shoots number / initial shoots number), shoots length, productivity (product of proliferation rate and shoots length) and the surface of the fourth leaf of the main shoot was measured. TIS culture improved both cultivars micropropagation when compare with agar semi-solid medium. Best productivity was obtained by the 'Canino' cultivar, with values of 6.34 in TIS and 3.57 in semi-solid medium. The best results of leaf surface were obtained in 'Mirlo Rojo' cultivated in TIS (3.98 cm^2), meanwhile in semi-solid medium the value was 1.68 cm^2.

Keywords: in vitro culture, proliferation, semi-solid medium, bioreactor.

Introducción

El cultivo in vitro es una herramienta biotecnológica que permite la conservación y proliferación de especies con un bajo ratio de propagación, como es el caso de los frutales de hueso (Vidal y Sánchez, 2019). La micropropagación es una de las aplicaciones más comunes del cultivo in vitro y consiste en la obtención de plantas uniformes y genéticamente idénticas (clones) a partir de un fragmento (explanto) de la planta madre. El explanto más utilizado en esta técnica son las yemas vegetativas de las plantas (George et al., 2008).

Disponer de protocolos eficientes de micropropagación permite la obtención de gran cantidad de material vegetal clonal en condiciones controladas y asépticas. El medio semisólido es el método de cultivo comúnmente utilizado en el cultivo in vitro de albaricoquero. Este medio se caracteriza por incorporar agar a baja concentración en su composición, permitiendo que los brotes crezcan erguidos.

El Grupo de Biotecnología de Frutales del CEBAS-CSIC ha desarrollado protocolos de micropropagación para distintas variedades de albaricoquero utilizando medio semisólido (Pérez-Tornero et al., 2000; Pérez-Tornero y Burgos, 2000). Aunque estos protocolos son eficientes, es interesante establecer nuevos métodos en los que la tasa de multiplicación y la calidad del material vegetal sean óptimas.

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SITs) son un método de cultivo efectivo para la producción de material vegetal a gran escala en medio líquido. Para emplear esta técnica se necesitan recipientes (biorreactores) que permiten la entrada y salida de aire filtrado, y se dividen en dos zonas claramente aisladas, separando la localización del medio líquido y la de los brotes. La fuerza impulsora del aire bombeado permite el contacto temporal entre las plantas y el medio líquido, evitando la inmersión continua, y proporciona una adecuada y renovada atmósfera en el interior de los biorreactores (Etienne y Berthouly, 2002; Xiao et al., 2011).

El objetivo de este trabajo consiste en estudiar la micropropagación de las variedades ‘Canino’ y ‘Mirlo Rojo’ en biorreactores de inmersión temporal y su comparación frente al tradicional cultivo en medio semisólido.

Material y Métodos

Material vegetal

El material vegetal utilizado en este experimento procede de las variedades ‘Mirlo Rojo’ y ‘Canino’ de la colección in vitro que posee el Grupo de Biotecnología de Frutales del CEBAS-CSIC.

Proliferación en medio semisólido

Las plantas crecen y se multiplican in vitro en tarros con una densidad aproximada de 12 brotes por tarro, siendo la longitud inicial de cada brote de aproximadamente 1,5 cm. El medio de cultivo semisólido de micropropagación de brotes (SMM) ha sido descrito por Petri et al. (2015). Brevemente, el medio de cultivo contiene los macronutrientes QL (Quoirin y Lepoivre, 1977), los micronutrientes y vitaminas DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), cloruro de calcio 3mM, floroglucinol 0,8 mM, 30 g · L^{-1} de sacarosa, 7 g · L^{-1} de agar y la adición de reguladores del crecimiento (BAP-ribósido 1,12 µM, IBA 0,05 µM, meta-topolina 2,1 µM y adenina 29,6 µM). El medio se ajusta a pH 5,7 añadiendo NaOH antes de ser autoclavado (121 ºC durante 20 minutos).

Las plantas se mantienen en una cámara de cultivo con condiciones controladas de 23 ± 1 ºC, fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad (56 µmol m^{-2} · s^{-1}) y se pasan a nuevo medio cada 4 semanas.

Proliferación en Sistema de Inmersión Temporal

Se han utilizado biorreactores de la empresa Plant Form para la micropropagación de los brotes en el medio líquido. Los biorreactores tienen una capacidad de 4 L y se han utilizado filtros de aire de 0,22 μm para mantener la esterilidad en el interior del contenedor.

Cada biorreactor tiene una densidad inicial entre 30 y 40 brotes de una longitud aproximada de 1,5 cm. Los brotes introducidos en los biorreactores han sido previamente multiplicados en medio semisólido. El medio de cultivo del contenedor consiste en 500 mL de SMM líquido (el medio descrito en "Proliferación en medio semisólido" sin añadir el agar). Las condiciones óptimas de funcionamiento para el cultivo de albaricoquero son 2 minutos de inmersión cada 6 horas y 3 minutos de aireación cada 3 horas.

El medio de los biorreactores se cambia a las 4 semanas de cultivo.

Medida de la micropropagación y análisis estadístico

Se ha analizado la micropropagación de las dos variedades ('Mirlo Rojo' y 'Canino') en cada sistema de cultivo (medio semisólido y medio líquido) durante dos ciclos de cultivo. En el caso del medio semisólido, se han estudiado 4 tarros con 12 brotes cada uno de ellos por cada variedad y ciclo de cultivo. En el caso del medio líquido, se han examinado 3 biorreactores con 15 brotes cada uno de ellos para cada variedad y ciclo de cultivo.

Los parámetros utilizados para medir la proliferación han sido: la proliferación (número de brotes nuevos a partir de un brote inicial), la longitud de los brotes nuevos, la productividad (proliferación x longitud media de los brotes) y la superficie de la cuarta hoja del tallo principal del brote.

El análisis estadístico se ha realizado con el programa SAS versión 9.4 (SAS Institute 1988). Se ha realizado un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para comprobar si existen diferencias significativas entre sistemas de cultivo.

Resultados y Discusión

El cultivo en SITs ha mejorado la micropropagación de ambas variedades con respecto al cultivo en medio semisólido (Figura 1). La variable que más se ha visto afectada por el cambio de cultivo ha sido la productividad. Esta variable es el resultado del producto entre las variables tasa de proliferación y longitud media de los tallos, por lo que representa la cantidad de tejido vegetal útil para ser micropropagado. La productividad ha sido superior en el cultivo en SITs un 77,6 % para la variedad 'Canino' y un 48,0 % para 'Mirlo rojo' respecto al cultivo en medio semisólido. Los SITs también han mejorado significativamente la tasa de proliferación de ambas variedades, siendo un 24,2 % superior para la variedad 'Canino' y un 44,0 % para 'Mirlo rojo' con respecto a las tasas obtenidas en medio semisólido. En cuanto a la longitud media de los tallos, se han encontrado diferencias significativas en la variedad 'Canino' siendo en SITs de 2,76 cm frente a 1,92 cm del cultivo en medio semisólido. No obstante, aunque la longitud media para la variedad 'Mirlo rojo' también ha sido superior en SITs, no se han encontrado diferencias significativas (2,04 cm frente a 1,98 cm en medio semisólido). Por lo tanto, la gran mejora de la productividad experimentada en ambas variedades se debe principalmente al efecto de los SITs sobre la tasa de proliferación de las plantas, es decir, la producción y desarrollo de un mayor número de yemas vegetativas que se convierten en nuevos brotes. Por otro lado, se ha medido la superficie de la cuarta hoja del tallo principal del brote. El tamaño de las hojas de los brotes cultivados en SITs se ha incrementado un 103,3 % para la variedad 'Canino' y un 137 % para 'Mirlo rojo' (Figura 1).

Los resultados obtenidos muestran que los SITs tienden a incrementar el tamaño de todos los órganos de la planta, incluidas las hojas, creando así brotes más frondosos. En la Figura 2A y 2B se observa

esta mayor producción de material vegetal y de una calidad óptima. Etienne y Berthouly (2002) indican que, una vez optimizado el protocolo, las plantas cultivadas en SITs generalmente muestran mayor vigor y calidad que aquellas cultivadas en medio semisólido. Diversos autores han descrito las ventajas de los SITs para micropropagar especies frutales (Jin et al., 2013; Benelli y De Carlo, 2018). Zare Khafri et al. (2021) han establecido un protocolo para la micropropagación de tres variedades de albaricoquero y han estudiado el comportamiento de las plantas en SIT y en medio semisólido con agar. Sus resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, ya que el cultivo en SITs conseguía mejorar tanto la micropropagación como la calidad de los brotes con respecto al medio semisólido con agar.

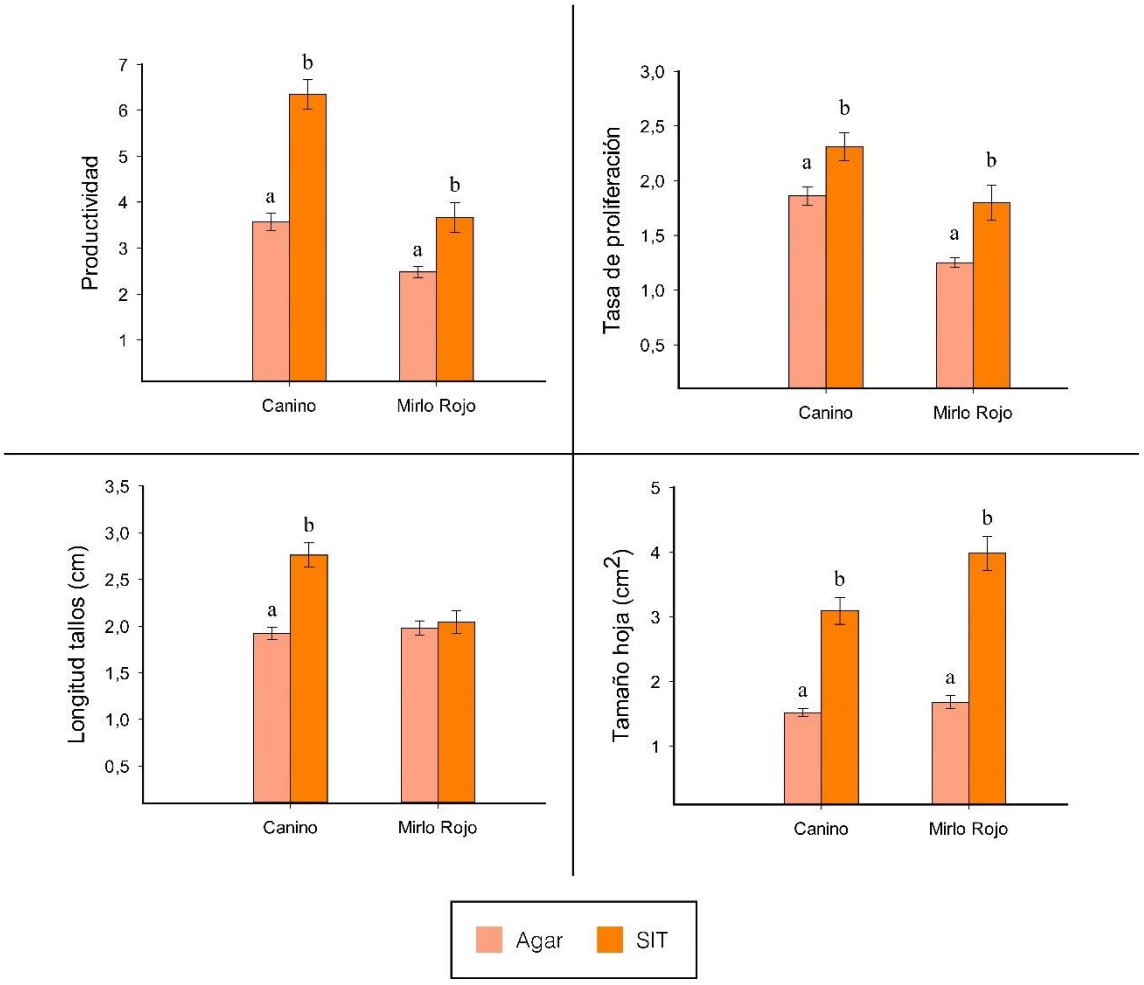


Figura 1. Efecto del cultivo de las variedades de albaricoquero 'Canino' y 'Mirlo Rojo' en medio semisólido con agar y en Sistemas de Inmersión Temporal (SITs) sobre la productividad, la tasa de proliferación, la longitud media de los tallos y el tamaño de la hoja. Las barras representan el error estándar. Letras diferentes para cada sistema de cultivo representan diferencias significativas (p<0,05).

El efecto que provoca el SIT mejorando la micropropagación de las plantas no es inmediato. Se ha realizado el mismo estudio con ambas variedades durante dos ciclos de cultivo consecutivos para cada uno de los sistemas de cultivo. No existen diferencias significativas para las variables productividad y proliferación entre los dos ciclos de cultivo en medio semisólido con agar en ninguna variedad, y solo hay una pequeña variación en el resto de las variables (Tabla 1). Sin embargo, los resultados obtenidos en el segundo subcultivo en SIT son significativamente diferentes al primer ciclo de cultivo para todos los caracteres medidos en ambas variedades (Tabla 2).

Tabla 1. Estudio de la micropropagación de las variedades 'Canino' y 'Mirlo Rojo' en medio semisólido con agar durante dos ciclos de cultivo consecutivos. Letras diferentes para cada variedad y ciclo de cultivo representan diferencias significativas (p<0,05).

	'Canino'		'Mirlo Rojo'	
	Agar I	**Agar II**	**Agar I**	**Agar II**
Productividad	4,00 [a]	3,13 [a]	2,63 [a]	2,31 [a]
Proliferación	1,81 [a]	1,91 [a]	1,21 [a]	1,29 [a]
Longitud del tallo (cm)	2,20 [a]	1,64 [b]	2,17 [a]	1,80 [a]
Tamaño de hoja (cm^2)	1,56 [a]	1,49 [a]	2,02 [a]	1,34 [b]

Tabla 2. Estudio de la micropropagación de las variedades 'Canino' y 'Mirlo rojo' en SITs durante dos ciclos de cultivo consecutivos. Letras diferentes para cada variedad y ciclo de cultivo representan diferencias significativas (p<0,05).

	'Canino'		'Mirlo Rojo'	
	SIT I	**SIT II**	**SIT I**	**SIT II**
Productividad	5,65 [b]	7,33 [a]	2,12 [b]	4,60 [a]
Proliferación	2,05 [b]	2,69 [a]	1,27 [b]	2,12 [a]
Longitud del tallo (cm)	2,76 [a]	2,76 [a]	1,67 [b]	2,17 [a]
Tamaño de hoja (cm^2)	3,12 [a]	3,03 [a]	3,57 [b]	4,22 [a]

Estos resultados pueden deberse a la forma en la que se prepara el brote para el sistema de cultivo. Los brotes cultivados en medios con agar deben tener la base del tallo limpia, sin hojas ni yemas, para introducirlos en el medio semisólido y que queden erguidos. Sin embargo, los brotes cultivados en SITs se depositan sobre una bandeja porosa en posición horizontal, sin necesidad de estar erguidos. Este sistema de cultivo permite que el brote contenga yemas vegetativas a lo largo de todo el tallo y, por lo tanto, la obtención de un mayor número de brotes a partir de uno mismo (Figura 2C).

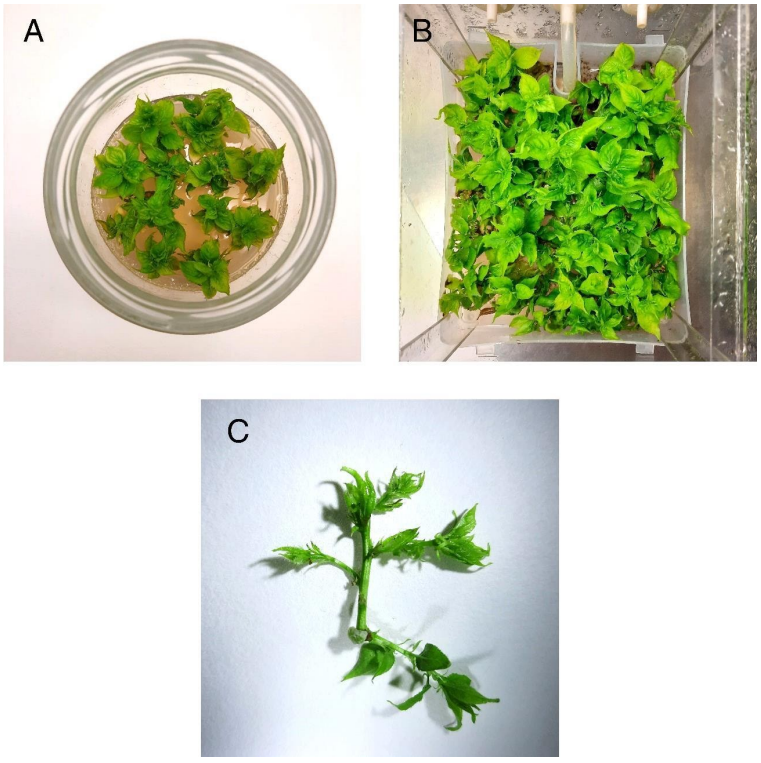


Figura 2. Aspecto de los brotes de 'Canino' cultivados en medio semisólido con agar (A) y en SIT (B). Proliferación típica de un brote de 'Canino' tras cultivo en SIT (C).

Conclusiones

El uso de los SITs mejora notablemente la micropropagación de las variedades 'Mirlo Rojo' y 'Canino' con respecto al tradicional cultivo en medio semisólido.

Asimismo, el funcionamiento óptimo de los SITs se alcanza a partir del segundo cultivo en biorreactores.

Es conveniente adaptar otras variedades de albaricoquero comercialmente interesantes a condiciones de cultivo en Sistemas de Inmersión Temporal.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Proyecto INIA RTA2017-00011-C03-02. Cristian Pérez Caselles cuenta con una Beca de Formación del Personal Universitario del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Bibliografía

Benelli, C., De Carlo, A. (2018). In vitro multiplication and growth improvement of Olea europaea L. cv Canino with temporary immersion system (Plantform™). 3 Biotech, 8, 1–5. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1346-4

Driver, J., Kuniyuki, A. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience, 19, 507–509.

Etienne, H., Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Cult., 69, 215–231. https://doi.org/10.1023/A:1015668610465

George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. (2008). Micropropagation : Uses and Methods. In Plant propagation by tissue culture. Nueva York, Springer, pp. 29–64. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_2

Jin, M. Y., Piao, X. C., Xiu, J. R., Park, S. Y., Lian, M. L. (2013). Micropropagation using a bioreactor system and subsequent acclimatization of grape rootstock "5BB." Sci. Hortic., 164, 35–40. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.004

Pérez-Tornero, O, Burgos, L. (2000). Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. Plant Cell Tissue Organ Cult., 63, 133–141. https://doi.org/10.1023/A:1006430718024

Pérez-Tornero, O., López, J. M., Egea, J., Burgos, L. (2000). Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (prunus armenica L.) cv. Canino. J. Hortic. Sci. Biotechnol., 75, 283–286. https://doi.org/10.1080/14620316.2000.11511238

Petri, C., Wang, H., Burgos, L., Sánchez-Navarro, J., Alburquerque, N. (2015). Production of transgenic apricot plants from hypocotyl segments of mature seeds. Sci. Hortic., 197, 144–149. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.023

Quoirin, M., Lepoivre, P. (1977). Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus. Acta Hortic., 78, 437–442.

Vidal, N., Sánchez, C. (2019). Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. Eng. Life Sci., 19, 896–915. https://doi.org/10.1002/elsc.201900041

Xiao, Y., Niu, G., Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. Plant Cell Tissue Organ Cult., 105(2), 149–158. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9

Zare Khafri, A., Solouki, M., Zarghami, R., Fakheri, B., Mahdinezhad, N., Naderpour, M. (2021). In vitro propagation of three Iranian apricot cultivars. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 57, 102–117. https://doi.org/10.1007/s11627-020-10112-w

Efecto de la aplicación de ácido salicílico en precosecha sobre la calidad de pimiento verde en la recolección y conservación

A. Rodríguez, A. Dobón-Suarez, M.E. García-Pastor, P.J. Zapata y M. Giménez

Dept. Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel Km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, alejandro.rodriguez02@alu.umh.es

Resumen

El cultivo de pimiento tiene gran importancia a nivel mundial siendo uno de los vegetales más consumidos gracias a sus propiedades organolépticas y a su elevada composición en compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud. El ácido salicílico (AS) es una hormona vegetal que juega un papel clave en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos durante el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en la inducción de resistencia de las plantas contra patógenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación en precosecha de AS en distintos momentos del desarrollo de la planta, con el fin de mejorar la calidad y resistencia a podredumbres en pimiento. Los ensayos se realizaron en pimiento de la variedad Herminio cultivados en invernadero y fueron tratados con AS a concentraciones (0.5, 1 y 5 mM). Los resultados mostraron que todos los pimientos tratados con AS redujeron la tasa de respiración en el momento de la recolección, así como las pérdidas de peso durante el almacenamiento en frío con respecto a los pimientos control en un 20 % y un 74 % respectivamente. Además, todos los tratamientos dieron lugar a pimientos con mayor firmeza y sólidos solubles totales en el momento de la recolección, y durante 21 días de almacenamiento a 2 ºC. Por otro lado, se observó una reducción de un 87 % en la aparición de podredumbres en los pimientos tratados con AS, obteniéndose los mejores resultados en los pimientos tratados con 0,5 mM. En conclusión, la aplicación de AS en precosecha podría ser una herramienta segura y respetuosa con el medio ambiente con un uso potencial para mejorar la calidad del pimiento en el momento de la recolección y el mantenimiento de los atributos de calidad durante su conservación.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, elicitores, pérdida de peso, firmeza, podredumbres

Effect of the application of salicylic acid in pre-harvest on the quality of green pepper in harvesting and conservation

Abstract

Green pepper crop has a great importance worldwide, being one of the most consumed vegetables due to its organoleptic properties and its high composition of bioactive compounds with health beneficial effects. Salicylic acid (SA) is a hormone plant that plays a key role in a wide range of physiological processes during plant growth and development, as well as inducing plant resistance against pathogens. The aim of this work was to evaluate the effect of pre-harvest application of SA at different moments of the plant's development, in order to improve the quality and resistance to decay in green peppers. The tests were carried out with peppers of Herminio cultivar grown in a greenhouse and were treated with SA at different concentrations (0.5, 1 and 5 mM). The results showed that all treated peppers with SA reduced the respiration rate at harvest time and reduced weight losses during cold storage with respect to control peppers at 20 % and 74 %, respectively. In addition, all treatments lead to peppers with greater firmness and total soluble solids at harvest time, and during 21 days of storage at 2 ºC. On the other hand, a 87 % of decrease in the decay incidence in treated peppers was observed obtaining the best results in peppers treated with 0.5 mM. In conclusion, the application of pre-harvest SA treatments could be a safe and environmentally friendly tool with a potential use to improve pepper quality at harvest time and maintain quality attributes during the storage period.

Keywords: Capsicum annuum, elicitors, weight loss, firmness, decay

Introducción

La demanda de productos frescos y naturales aumenta año tras año debido a las nuevas tendencias y necesidades e importancia que se le otorga al cuidado y mantenimiento de un estilo de vida y dieta más saludable. En el caso de frutas y hortalizas, España es el mayor productor de la Unión Europea por delante de Italia (MAPA, 2021). Una de las hortalizas más demandadas es el pimiento (*Capsicum annuum*), siendo la tercera hortaliza más producida en España por detrás del tomate y la cebolla. Esto supone a nivel económico, que el cultivo del pimiento se presente como una pieza clave, no solo a nivel nacional, sino también a nivel europeo, donde adquiere verdadera importancia siendo la hortaliza que mayor volumen de ventas representa en cuanto a exportaciones españolas de productos vegetales frescos (MAPA, 2019).

El pimiento es un producto típico del litoral mediterráneo, localizándose en la provincia de Almería y Murcia la mayor extensión de este cultivo. Es rico en compuestos bioactivos como los fenoles (flavonoides principalmente), carotenoides y vitamina C, que le confieren sus propiedades organolépticas características (flavor, color, firmeza, etc.) que hacen del pimiento un importante recurso gastronómico tanto dentro como fuera de España. Los compuestos bioactivos son los responsables en mayor medida de la capacidad antioxidante que hace del pimiento un alimento interesante. Los antioxidantes ayudan a mejorar las actividades biológicas del organismo, así como a la eliminación de radicales libres que contribuyen a la prevención de enfermedades coronarias o el cáncer. Además, estudios recientes sugieren que la capacidad antioxidante del pimiento puede ser útil para la prevención de la enfermedad de Alzheimer (Thuphairo et al., 2019).

La calidad sensorial y vida útil del producto es crucial para su venta y consumo posterior. Por otro lado, la preocupación y concienciación medioambiental repercute en la demanda de productos, priorizando cultivos sostenibles y la disminución o eliminación de pesticidas químicos, a favor del uso de nuevas técnicas y compuestos mucho más respetuosos con el medio ambiente y más beneficiosos para el consumo humano. Entre estos compuestos, el ácido salicílico (AS) ha sido estudiado como una herramienta alternativa para la mejora y prolongación de la vida útil de los frutos después de su recolección. El AS es una hormona vegetal implicada en gran cantidad de procesos fisiológicos en las plantas interviniendo en la floración, maduración de frutos, así como en el sistema de defensa contra estrés biótico y abiótico, entre otros. Al ser compuestos naturales, organismos como la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos lo considera un compuesto GRAS, es decir, compuestos generalmente reconocidos como seguros.

El uso de elicitores es una práctica utilizada y ha sido empleada en numerosos estudios dando buenos resultados sobre el rendimiento de la cosecha (García-Pastor et al., 2020 a, b), mejora del aspecto del fruto (Martínez-Esplá et al., 2018), incremento de la resistencia frente a microorganismos (Fayz et al., 2021), incremento de compuestos bioactivos o aumento de su vida útil en postcosecha (Valero et al., 2011). Se han estudiado los tratamientos con AS y sus derivados, individualmente y en combinación con otros tratamientos con el fin de mejorar y mantener la calidad postcosecha del pimiento. Los resultados obtenidos con tratamientos postcosecha indican una mejora sustancial de los frutos, manteniendo el aspecto, la textura y evitando los daños por frío (Rehman et al, 2021). No se encuentran datos sobre el comportamiento y la maduración de pimiento tras el uso de elicitores con AS en precosecha, donde se observen los cambios durante el almacenamiento en refrigeración.

Por tanto, el objetivo de este estudio se centra en la aplicación de AS mediante pulverización foliar en distintos momentos del desarrollo de la planta, con el fin de evaluar su efecto sobre la calidad de los pimientos en el momento de la recolección y durante su almacenamiento postcosecha, así como la resistencia de éstos a las podredumbres.

Material y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

Los ensayos se llevaron a cabo en una finca comercial localizada en El Raal, Región de Murcia (España), en la campaña 2020. La variedad de pimiento utilizada fue 'Herminio' tipo 'Lamuyo' y fue cultivada en invernadero. Se realizaron tratamientos precosecha con ácido salicílico (AS) a tres concentraciones (0,5, 1 y 5 mM) y un grupo control. Se llevaron a cabo un total de 4 tratamientos (Tabla 1), aplicados mediante pulverización foliar a lo largo del ciclo de cultivo.

Tabla 1. Fechas de aplicación de los tratamientos con AS foliar.

Tratamiento Nº	Día
T1	24 Febrero
T2	17 Marzo
T3	6 Abril
T4	29 Abril

Los pimientos se recolectaron el 4 de mayo y fueron transportados al laboratorio para realizar los ensayos de conservación. Se seleccionaron al azar pimientos homogéneos y sin defectos para llevar a cabo el ensayo de conservación. Para cada tratamiento y día de muestreo se seleccionaron 5 pimientos por 3 réplicas, se pesaron y almacenaron a 2 ºC y 85 % humedad relativa. Los muestreos se realizaron el día de recolección (día cero), a los 7, 14 y 21 días de conservación. En cada muestreo se determinó la tasa de respiración, pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles y acidez titulable, fenoles totales y la incidencia de podredumbres de los pimientos.

Tasa de respiración

La tasa de respiración fue determinada siguiendo el protocolo descrito en Giménez et al. (2016) con ligeras modificaciones. Los pimientos fueron colocados individualmente en frascos de vidrio herméticamente cerrados de 2 litros de capacidad durante 60 minutos. La concentración de CO_2 se midió utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu^{TM} GC-14B (Kyoto, Japon) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). Los resultados se expresaron en mg CO_2 kg^{-1} h^{-1}.

Pérdida de peso

Las pérdidas de peso se determinaron semanalmente los días de análisis con ayuda de una balanza Radwag WLC 2/A2 (Radwag Wagi Elektroniczne). Todos los pimientos se pesaron en el momento inicial de la conservación (día 0). Los resultados se expresaron en tanto por cien respecto al peso inicial.

Firmeza

La firmeza se determinó individualmente para todos los pimientos usando un Texturómetro TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, UK), aplicando una deformación de un 5 % del pimiento. Los resultados se expresaron como la relación entre la fuerza aplicada y la distancia recorrida para dicha deformación (N mm^{-1}).

Sólidos solubles totales y Acidez titulable

La determinación de los sólidos solubles totales (SST) se llevó a cabo tras un análisis destructivo, obteniendo zumos de cada replica de pimiento. Posteriormente se tomaron medidas por duplicado con la ayuda de un refractómetro digital Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japón) a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como g 100 g^{-1} de la media ± ES para cada tratamiento. Por otro lado, el parámetro acidez titulable (AT) se determinó con los zumos extraídos anteriormente. Utilizando 1 mL de zumo diluido en 25 mL de agua destilada para su valoración con NaOH 0,1 N, con la ayuda de un pH-metro 785 DMP Titrino (Metrohm) de sensibilidad ± 0,01 pH. Los resultados se

expresaron como g de ácido málico equivalente 100 g $^{-1}$ de peso fresco, las medidas se realizaron por duplicado.

Fenoles totales

La extracción de fenoles en pimiento fue realizada según se describe en Dobón-Suárez et al. (2021). La determinación y cuantificación del contenido en fenoles totales se realizó por el método Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico 100 g $^{-1}$.

Incidencia de podredumbres

Semanalmente, coincidiendo con los días de muestreo, se realizó el recuento de todos los pimientos podridos para cada uno de los tratamientos conservados a 2 °C. Los resultados se expresaron cómo porcentaje (%) de podrido acumulado con respecto al total de pimientos utilizados en el ensayo de conservación durante 21 días.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en todas las variables medidas, siendo la fuente de variación el tratamiento realizado con AS en las diferentes concentraciones. Se realizó una comparación de medias usando el test HSD de Tukey para determinar si existían diferencias significativas a $p< 0,05$. Todos los análisis se realizaron usando el software SPSS v.22.0 (IBM, Corp., Armonk, NY, USA).

Resultados y Discusión

El tratamiento precosecha con AS a concentración de 0,5 mM mostró una tasa de respiración un 20 % menor ($p<0,05$) en el día de la recolección frente al control y resto de tratamientos (Figura 1). Se produjo una disminución de la tasa de respiración durante el periodo de conservación en frío, siendo un 55 % menor la tasa de respiración en los pimientos tratados que en los controles. Tras 21 días de almacenamiento, se observaron de nuevo diferencias entre el control y los tratamientos con AS, presentando mejoras de un 60 % en los pimientos tratados con AS 0,5 mM, que registraron la menor tasa de respiración.

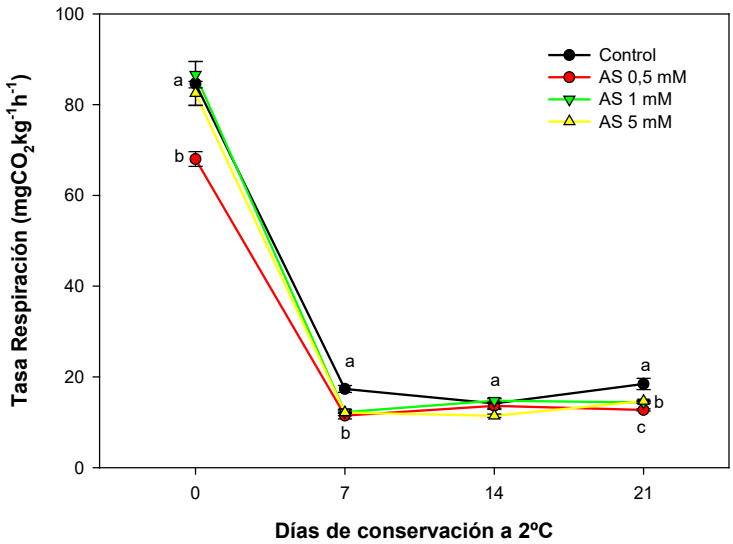


Figura 1. Tasa de respiración (mg CO_2 kg^{-1} h^{-1}) en la recolección (día 0) y durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 2 ºC de pimientos sin tratamiento (control) y con tratamientos precosecha con ácido salicílico (AS) a 0,5 mM, 1 mM y 5 mM. Los datos representados son la media ± ES. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p<0,05$) entre los datos obtenidos de los tratamientos para cada día de muestreo.

La aplicación de AS interviene en el proceso de respiración de los frutos disminuyendo la producción de etileno e inhibiendo la producción de enzimas que degradan las paredes celulares, dando como resultado el ablandamiento del fruto (Zhang et al., 2003). Resultados similares se observaron en trabajos previos realizados con AS tanto en pre- como en postcosecha en granadas (García-Pastor et al., 2020a) o en limón (Serna-Escolano et al., 2020).

La pérdida de peso aumentó paulatinamente desde el día de la recolección. Tras 21 días de almacenamiento refrigerado los pimientos control fueron aquellos que mayor pérdida de peso presentaron, observándose una mejora significativa (p<0,05) en la reducción de pérdidas de peso en todos los pimientos tratados con AS (Figura 2A).

Se observó como la aplicación del AS influyó en el comportamiento fisiológico de los pimientos al presentar diferencias respecto a los pimientos no tratados. Una reducción de la actividad enzimática causada por el tratamiento con AS podría reducir la tasa de respiración y las pérdidas de peso como se ha observado en otros estudios realizados con frutos de naranja (Mollapur et al., 2016) y granada (García-Pastor et al., 2020a) mediante la aplicación precosecha de AS. Resultados similares también fueron observados cuando se aplicó este tratamiento en postcosecha en azufaifo (Zeraatgar et al., 2018), pimiento (Rehman et al., 2021) y limón (Serna-Escolano et al., 2021).

En el momento de la recolección, se observaron diferencias significativas en la firmeza entre los pimientos tratados con AS a la concentración de 0,5 y 1 mM y los pimientos control. Por otro lado, no se observaron diferencias entre los pimientos controles y los tratados con AS a la concentración de 5 mM. Durante el periodo de almacenamiento se produjo una disminución progresiva en la firmeza en todos los tratamientos (Figura 2B). Tratamientos AS a la concentración de 0,5 y 1 mM dieron lugar a una menor pérdida de firmeza durante los primeros 14 días de almacenamiento; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los pimientos tratados y los no tratados en el último día de conservación (21 días).

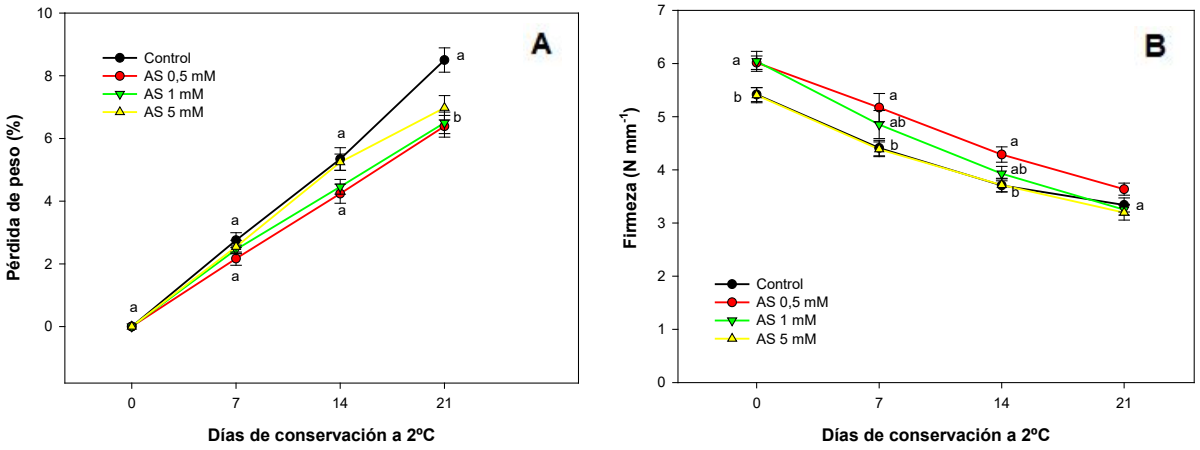


Figura 2. A) Pérdida de peso (%); B) Firmeza (N mm^{-1}) en la recolección (día 0) y durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 2 ºC de pimientos sin tratamiento (control) y con tratamientos precosecha con ácido salicílico (AS) a 0,5 mM, 1 mM y 5 mM. Los datos representados son la media ± ES. Diferentes letras muestran diferencias significativas (p<0,05) entre los datos obtenidos de los tratamientos para cada día de muestreo.

La firmeza en la fruta nos puede indicar su calidad y frescura. Martínez-Esplá et al. (2017) aplicaron ácido salicílico como tratamiento precosecha en ciruelas obteniendo resultados significativos entre los frutos tratados y no tratados. Estos resultados son similares a las diferencias obtenidas en este estudio a lo largo de los 14 primeros días, donde el tratamiento con AS 0,5 mM marcó diferencias significativas

respecto al grupo control. Resultados similares fueron observados en granada y uva de mesa por García-Pastor et al. (2020a, b) al comprobar que los tratamientos de AS consiguieron frutos más firmes que los no tratados al final del estudio. Del mismo modo, estudios con tratamientos postcosecha revelan la capacidad del SA de reducir la pérdida de firmeza de los frutos durante un tiempo más prolongado (Kazemi et al., 2015). Según Zhang et al. (2003), existe una correlación positiva entre la presencia de AS libre y la firmeza de los frutos, donde la aplicación de AS además de disminuir la producción de etileno, inhibió la actividad de enzimas como la lipoxigenasa que favorecen el ablandamiento de los frutos.

En el momento de la recolección los resultados mostraron que, para todos los tratamientos, la cantidad de SST fue significativamente superior a los pimientos no tratados, obteniéndose la mayor concentración en los pimientos tratados con AS 1 mM. Estos pimientos presentaron la mayor cantidad de SST durante los primeros 14 días obteniéndose valores similares a los 21 días para los pimientos tratados con AS 0,5 y AS 1 mM. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los pimientos tratados con AS 5 mM y los pimientos control tras 21 días de almacenamiento a 2 ºC (Figura 3A).

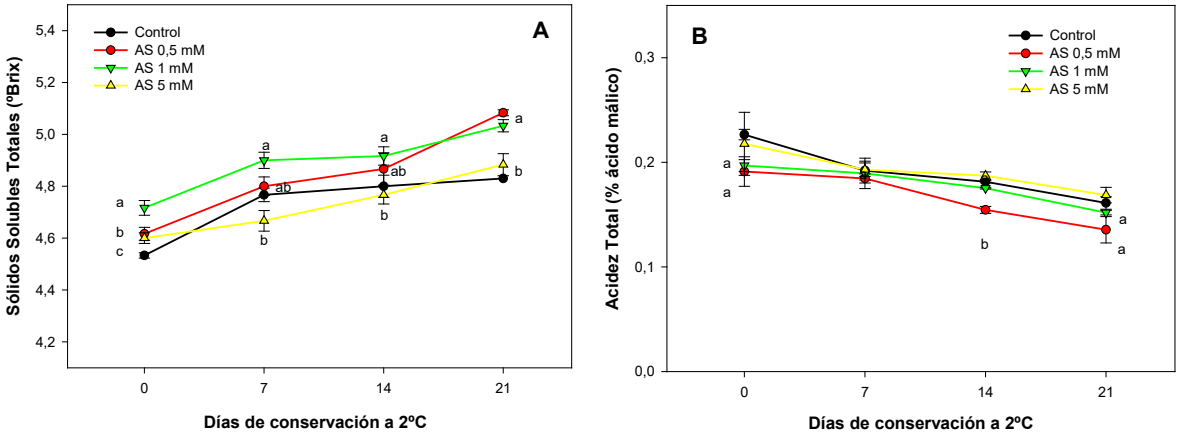


Figura 3. A) Sólidos solubles totales (ºBrix); B) Acidez total (% ácido málico) en la recolección (día 0) y durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 2 ºC de pimientos sin tratamiento (control) y con tratamientos precosecha con ácido salicílico (AS) a 0,5 mM, 1 mM y 5 mM. Los datos representados son la media ± ES. Diferentes letras muestran diferencias significativas (p<0,05) entre los datos obtenidos de los tratamientos para cada día de muestreo.

La mayor cantidad de SST en los pimientos tratados puede deberse a un incremento de la tasa fotosintética en la planta que podría dar lugar a un aumento en la acumulación de azúcares debido a la aplicación de los tratamientos con AS (Serna-Escolano et al., 2021). Posteriormente, durante el periodo de conservación, la cantidad de SST se vio incrementada con el paso de los días debido a la maduración de los pimientos. El proceso de maduración del pimiento conlleva la degradación de los polisacáridos en azúcares, dando lugar a un incremento de los sólidos solubles totales. Además, este aumento de los SST podría estar relacionado con la pérdida de peso mostrada durante el proceso de conservación (Dobón-Suárez et al., 2021). Otros estudios reportaron resultados similares observando un aumento de los sólidos solubles totales en granada y limón tratados con AS en precosecha (García-Pastor et al., 2020a, b; Serna-Escolano et al., 2021), así como en cerezas y ciruelas tratadas en postcosecha (Valero et al., 2011; Davarynejad et al., 2015)

En cuanto a la acidez total (AT) de los frutos, se observó una disminución general de la misma con el paso del tiempo sin encontrar diferencias significativas entre los pimientos tratados y el grupo de control

(Figura 3B). Esta disminución se puede relacionar con el resultado del metabolismo de los principales ácidos orgánicos presentes en el pimiento (Dobón-Suárez et al., 2021).

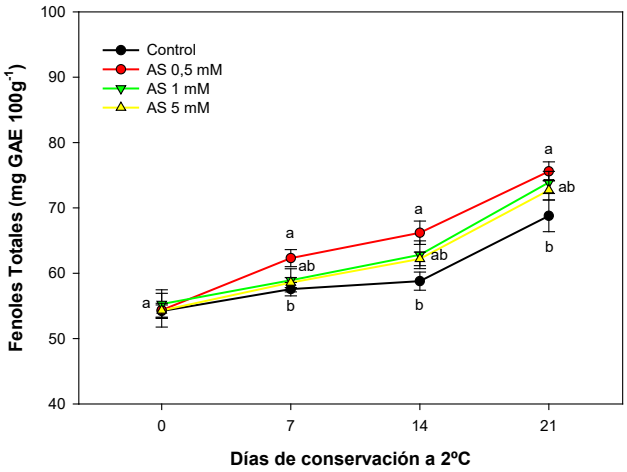


Figura 4. Fenoles totales (mg GAE 100 g^{-1}) en la recolección (día 0) y durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 2 ºC de pimientos sin tratamiento (control) y con tratamientos precosecha con ácido salicílico (AS) a 0,5 mM, 1 mM y 5 mM. Los datos representados son la media ± ES. Diferentes letras muestran diferencias significativas (p<0,05) entre los datos obtenidos de los tratamientos para cada día de muestreo.

Con respecto al contenido en fenoles totales, no se observaron diferencias significativas entre los pimientos tratados y los controles en el momento de la recolección (Figura 4). Sin embargo, a partir del día 7 de conservación se observaron diferencias significativas entre los pimientos tratados y control, siendo los pimientos tratados con AS 0,5 mM, los que mayor concentración de fenoles presentaron, y este incremento se mantuvo hasta los 21 días de almacenamiento refrigerado. Los tratamientos precosecha con AS 1 mM y 5 mM, incrementaron la concentración de fenoles con respecto al control, pero no se observaron diferencias significativas. El contenido en compuestos bioactivos en los pimientos, entre los que se encuentran los fenoles, es uno de los parámetros más apreciado por los consumidores debido a su actividad antioxidante con efectos beneficiosos para la salud. La cantidad de fenoles totales puede variar en función de la época del año, el clima o la duración del tiempo de la cosecha (Dobón-Suárez et al., 2021). Se ha observado que tratamientos postcosecha con AS y sus derivados incrementaron el contenido de fenoles totales en pimiento (Enas et al., 2019) y en granada (Sayyari et al., 2011) o en tratamientos precosecha en granada (García-Pastor et al, 2020a), uva de mesa (García-Pastor et al, 2020b) o limones (Serna-Escolano et al. 2021) entre otros, observándose un incremento de fenoles totales a lo largo de la conservación.

Finalmente, se calculó el porcentaje de podrido acumulado durante 21 días de almacenamiento refrigerado (Figura 5). Tras 21 días de almacenamiento refrigerado se pudrió un 16 % de los pimientos control, reduciéndose este porcentaje de forma significativa en todos los pimientos tratados. Los pimientos tratados con AS 5 mM, AS 1 mM y AS 0,5 mM redujeron las podredumbres en un 50, 75 y 87 %, respectivamente, obteniendo sólo un 2 % de pimientos podridos con la concentración 0,5 mM de AS.

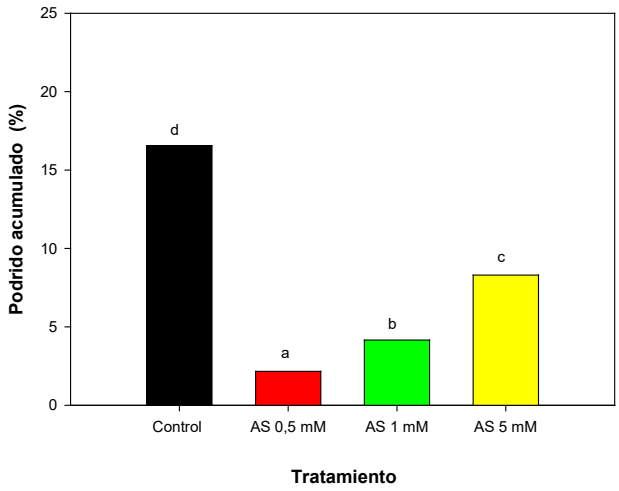


Figura 5. Podrido acumulado (%) en la recolección (día 0) y durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 2 ºC de pimientos sin tratamiento (control) y con tratamientos precosecha con ácido salicílico (AS) a 0,5 mM, 1 mM y 5 mM. Los datos representados son la media ± ES. Diferentes letras muestran diferencias significativas (p<0,05) entre los datos obtenidos de los tratamientos para cada día de muestreo.

Los resultados obtenidos muestran la capacidad del AS para retrasar la senescencia de los frutos, frenar el metabolismo que origina las pérdidas estructurales y mejorar la respuesta frente a los ataques de microorganismos. Resultados similares se observaron en pimiento cuando se aplicaron tratamientos postcosecha con salicilato de metilo donde mejoró el sistema antioxidante y la respuesta a los daños por frío (Rehman et al., 2021). Tratamientos postcosecha con AS en cerezas retrasaron el ablandamiento de los frutos (Valero et al., 2011). Del mismo modo, la aplicación de AS en pepinos redujo las pérdidas de peso y la aparición de daño por frío e incrementó el sistema antioxidante mejorando la calidad global del fruto (Zhang et al., 2015).

Conclusión

La aplicación foliar de AS en precosecha en pimiento de la variedad 'Herminio' incrementó la calidad de los pimientos en el momento de la recolección disminuyendo la tasa de respiración y aumentando su firmeza. Por otro lado, se redujeron las pérdidas de peso y las podredumbres en un 74% y 87% respectivamente sobre los pimientos no tratados tras 21 días de conservación, siendo la concentración de AS 0,5 mM la más efectiva. Por tanto, la aplicación foliar de AS en precosecha en plantas de pimiento podría ser una herramienta segura y respetuosa con el medio ambiente, con un uso potencial para mejorar la calidad del pimiento en el momento de la recolección y durante su conservación en frío.

Bibliografía

Davarynejad, G.H., Zarei, M., Nasrabadi, M.E., Ardakani, E., 2015, Effects of salicylic acid and putrescine on storability, quality attributes and antioxidant activity of plum cv. 'Santa Rosa'. Journal of Food Science and Technology, 52, 2053–2062, https://doi.org/10.1007/s13197-013-1232-3

Devi, J., Bhatia, S., Alam, M.S., Dillon, T.S., 2018, Effect of calcium and salicylic acid on quality retention in relation to antioxidative enzymes in radish stored under refrigerated conditions. Journal of Food Science and Technology, 55, 1116–1126, https://doi.org/10.1007/s13197-017-3027-4

Dobón-Suárez, A., Giménez, M.J., Castillo, S., García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., 2021, Influence of the Phenological Stage and Harvest Date on the Bioactive Compounds Content of Green Pepper Fruit. *Molecules*. 26(11):3099, https://doi.org/10.3390/molecules26113099

Enas, M., Eman, K., Fayz, A., 2019, Effect of pre-harvest application with some organic acids and plant oils on antioxidant properties and resistance to Botrytis cinerea in pepper fruits, Scientia Horticulturae, Volume 257, 108736, ISSN 0304-4238, https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108736.

Fayz, A., Eman, K., Maali, S., Tahsin, S., Yosra, A., 2021, Preharvest application of salicylic acid induces some resistant genes of sweet pepper against black mold disease. Eur J Plant Pathol 159, 755–768, https://doi.org/10.1007/s10658-020-02199-z

García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valero D., Serrano, M., 2020a, The Effects of Salicylic Acid and Its Derivatives on Increasing Pomegranate Fruit Quality and Bioactive Compounds at Harvest and During Storage, Frontiers in Plant Science, 11, https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00668

García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., Guillén, F., 2020b, Preharvest Salicylate Treatments Enhance Antioxidant Compounds, Color and Crop Yield in Low Pigmented-Table Grape Cultivars and Preserve Quality Traits during Storage. Antioxidants. 9(9):832, https://doi.org/10.3390/antiox9090832

Giménez, M.J., Valverde, J.M., Valero, D., Zapata, P.J., Castillo, S., Serrano, M., 2016. Postharvest methyl salicylate treatments delay ripening and maintain quality attributes and antioxidant compounds of 'Early Lory' sweet cherry. Postharvest Biology and Technology, 117, 102-109, https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.02.006

Kazemi, M., Aran, M., Zamani, S., 2011, Effect of Salicylic Acid Treatments on Quality Characteristics of Apple Fruits During Storage. American Journal of Plant Physiology, 6: 113-119, https://doi.org/10.3923/ajpp.2011.113.119

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020-2021, Cifras del Sector de Frutas y Hortalizas, https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/informacion_general.aspx (accessed 09 August 2021)

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019, Informe anual de comercio exterior, agroalimentario, pesquero y forestal, https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/Informe_anual.aspx (accessed 09 August 2021)

Martínez-Esplá, A., Serrano, M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Zapata, P.J., 2017, Enhancement of Antioxidant Systems and Storability of Two Plum Cultivars by Preharvest Treatments with Salicylates. International journal of molecular sciences, 18 (9), 1911, https://doi.org/10.3390/ijms18091911

Mollapur, Y., Miri, S., Hadavi, E., 2016, Comparison of foliar fertilizers and growth regulators on pre-harvest drop and fruit quality of 'Thompson Navel' orange. Open Agriculture, 1(1), 112-117, https://doi.org/10.1515/opag-2016-0015

Rehman, R.N.U., Malik, A.U., Khan, A.S., Hasan, M.U., Anwar, R., Ali, S., Haider, M.W., 2021, Combined application of hot water treatment and methyl salicylate mitigates chilling injury in sweet pepper (Capsicum annuum L.) Fruits, Scientia Horticulturae, Volume 283, 110113, ISSN 0304-4238, https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110113.

Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., 2011, Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates, Food Chemistry, Volume 124, Issue 3, Pages 964-970, ISSN 0308-8146, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.036.

Serna-Escolano, V., Martínez-Romero, D., Giménez, M.J., Serrano, M., García-Martínez, S., Valero, D., Valverde, J.M., Zapata, P.J., 2021, Enhancing antioxidant systems by preharvest treatments with methyl jasmonate and salicylic acid leads to maintain lemon quality during cold storage, Food Chemistry, Volume 338, 128044, ISSN 0308-8146, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128044.

Thuphairo K., Sornchan P., Suttisansanee U., 2019, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Inhibition of Key Enzymes Relevant to Alzheimer's Disease from Sweet Pepper (*Capsicum annuum*) Extracts. Prev Nutr Food Sci. 24(3):327-337, https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.327.

Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., 2011, Postharvest Treatments with Salicylic Acid, Acetylsalicylic Acid or Oxalic Acid Delayed Ripening and Enhanced

Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity in Sweet Cherry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (10), 5483-5489, https://doi.org/10.1021/jf200873j

Zeraatgar, H., Davarynejad, G.H., Moradinezhad, F., Abedi, B., 2018, Effect of salicylic Acid and Calcium Nitrate Spraying on Qualitative Properties and Storability of Fresh Jujube Fruit (Ziziphus jujube Mill.). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 46(1), 138-147, https://doi.org/10.15835/nbha46110743

Zhang, Y, Zhang, M., Yang, H., 2015, Postharvest chitosan-g-salicylic acid application alleviates chilling injury and preserves cucumber fruit quality during cold storage, Food Chemistry, Volume 174, Pages 558-563, ISSN 0308-8146, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.106.

Zhang, Y., Chen, K., Zhang, S., Ferguson, I., 2003, The role of salicylic acid in postharvest ripening of kiwifruit, Postharvest Biology and Technology, Volume 28, Issue 1, Pages 67-74, ISSN 0925-5214, https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00172-2

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Cultivo a media escala de líneas de tomate Muchamiel con resistencia a virus para su comercialización en Alicante

P. Carbonell, J.M. Sánchez-Roldán, A. Gómez, J.A. Cabrera, J.F. Salinas, A. Grau, A. Alonso, J.J. Ruiz, S. García-Martínez

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO), EPSO (UMH) Carretera de Beniel Km 3.2 Orihuela (Alicante). E-mail: sgarcia@umh.es

Resumen

La incidencia de virus es una de las principales causas del abandono del cultivo de variedades tradicionales de tomate. El Programa de Mejora Genética de Tomate del CIAGRO-UMH ha obtenido varios híbridos Muchamiel con resistencia genética al virus del mosaico del tomate (ToMV), al virus del bronceado del tomate (TSWV) y el virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (TYLCV). Estos híbridos han sido cultivados a pequeña escala en ensayos experimentales, obteniendo buenos resultados. Se considera interesante realizar el cultivo a media escala, en condiciones reales, en las instalaciones y con el manejo de un productor de tomate real.

En este trabajo se presenta el seguimiento y la evaluación agronómica de dos híbridos Muchamiel con resistencia a virus, cultivados en un invernadero comercial de Alicante, en sacos de fibra de coco, durante el ciclo de primavera-verano 2021. Se ha evaluado el ritmo de aparición de ramilletes, el cuajado de frutos y distintos parámetros relacionados con la producción comercial. Los resultados revelan que los dos híbridos pueden tener buen ritmo productivo y rendimiento en condiciones de cultivo comercial a media escala.

Palabras clave: Muchamiel, ToMV, TSWV, TYLCV, tradicional

Mid-scale production of Muchamiel tomato lines with virus resistance for marketing in Alicante

Abstract

The incidence of virus is one of the main reasons of the abandonment of farms of traditional tomato varieties. The Tomato Breeding Program of CIAGRO-UMH has obtained several Muchamiel hybrids with genetic resistance to tomato mosaic virus (ToMV), tomato spotted wilt virus (TSWV) and tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). These hybrids have been cultivated in small-scale experimental trials, getting good results. It is interesting to perform medium-scale cultivation, in real conditions, on farm and managed by a real tomato grower.

In this work, we present the tracing and agronomic evaluation of two Muchamiel hybrids with virus resistances, both grown in a commercial greenhouse from Alicante, in coconut fiber sacks, during the 2021 spring-summer cycle. The rate of appearance of trusses, the fruit set, and different parameters related with commercial yield were evaluated. Results reveal that the two hybrids can have good productive rate and yield under medium-scale commercial cultivation conditions.

Keywords: Muchamiel, ToMV, TSWV, TYLCV, traditional

Introducción

Actualmente, los agricultores españoles orientan su cultivo casi exclusivamente a la productividad, mediante el uso de modernas técnicas de cultivo y variedades híbridas comerciales con resistencias a virus y de gran comportamiento agronómico. Sin embargo, el cultivo de tomate en España sufre un estancamiento desde hace más de una década, al igual que el precio medio percibido por el agricultor, haciendo peligrar la viabilidad de muchas pequeñas y medianas explotaciones (Capobianco-Uriarte et al., 2017; Pérez-Mesa, 2009).

El cultivo de variedades tradicionales de tomate de gran calidad organoléptica puede ayudar a mejorar esta situación en algunos casos, ya que suelen ser muy apreciadas por el consumidor y permiten al agricultor obtener mejores precios de venta (Martinez-Carrasco et al., 2014; Ruiz y García-Martínez, 2009). Este es el caso del tomate Muchamiel, una variedad tradicional muy popular en algunas zonas de la provincia de Alicante.

La producción de estas variedades suele ser a pequeña escala, con una comercialización orientada a mercados tradicionales y comercios de especialidades. Una de las razones es que su cultivo es complejo para el agricultor ya que, además de ser menos productivas que los híbridos comerciales, no poseen genes de resistencia, lo que hace peligrar la producción en zonas de alta incidencia de virus. No es de extrañar que esta sea una de las principales causas del abandono del cultivo de estas variedades tradicionales de tomate en la Comunidad Valenciana (Cebolla-Cornejo et al., 2007).

Una forma de luchar contra esta amenaza es mediante creación de programas de mejora genética orientados a la introducción de resistencias genéticas en estas variedades. En este sentido, el Programa de Mejora Genética de Tomate del CIAGRO-UMH surge en 1998 para llevar a cabo la introgresión de tres genes de resistencia a tres virus (ToMV, TYLCV, y TSWV) en las variedades tradicionales Muchamiel y De la pera. A lo largo de los últimos 20 años, se ha logrado obtener diversas líneas de mejora, así como híbridos de tipo Muchamiel y De la pera que se han estudiado en diferentes ensayos experimentales. Algunas de estas variedades e híbridos se encuentran registradas en la Oficina Española de Variedades Vegetales y ya han sido cultivadas a pequeña escala por diversos agricultores (Carbonell, 2021).

En 2017, el Ayuntamiento de Mutxamel, la Universidad Miguel Hernández y ASAJA-Alicante empezaron el proceso para solicitar la Marca de Calidad CV Tomate Muchamiel. Fruto de estos esfuerzos, en 2019 nació la Asociación de Productores y Comercializadores de Tomate Muchamiel en la localidad de Mutxamel (Alicante), con la "vocación de representar, defender y promocionar la producción y comercialización del tomate Muchamiel. Entre sus primeros objetivos está la realización de las gestiones oportunas para la creación de la marca de calidad CV Tomate Muchamiel, la cual se prevé que se conceda antes de finalizar el año 2021. Las marcas colectivas y de garantía, entre las que se encuentra la Marca de Calidad CV, es una de las formas de diferenciación más interesantes para los productores, en especial para los de pequeño tamaño (Nicasio, 2017).

A principios de 2021, el Ayuntamiento de Mutxamel firmó un contrato con la Universidad Miguel Hernández para realizar el seguimiento y la evaluación agronómica y de calidad de 3 ensayos de tomate Muchamiel con resistencia a virus en el término municipal de Mutxamel durante el ciclo de primavera-verano 2021. En este trabajo se presenta el seguimiento y la evaluación agronómica preliminar de uno de los ensayos, en el que se han cultivado dos híbridos Muchamiel obtenidos dentro del Programa de Mejora Genética CIAGRO-UMH. Este ensayo es el primero que se lleva a cabo con híbridos Muchamiel en cultivo sin suelo en invernadero, con producción a media escala y fines comerciales.

Material y Métodos

Material vegetal

Se han estudiado 2 híbridos Muchamiel, 1200x4 y 1200x18, con resistencia en heterocigosis a ToMV, TYLCV y TSWV, obtenidos en el Programa de Mejora Genética de Tomate del CIAGRO-UMH. Estos híbridos se obtuvieron cruzando la línea de mejora UMH1200, con resistencia en homocigosis a los 3 virus citados, y las variedades tradicionales Muchamiel 4 y Muchamiel 18, que son los 2 híbridos Muchamiel más prometedores del programa. También se incluyó un híbrido comercial tipo pera (Pera F1), con resistencia a los 3 virus.

Condiciones de cultivo

El cultivo se realizó en un invernadero multitúnel situado en la Partida de Bonalba-Cotoveta, en el término municipal de Mutxamel (Alicante), con cubierta de plástico. Las plantas se cultivaron en sacos de fibra de coco de 1,1 m de longitud, y riego localizado por goteo. Las calles estaban cubiertas de plástico blanco. Las plantas se injertaron en el patrón comercial Armstrong (Syngenta), y fueron conducidas a un tallo. Para su entutorado de utilizaron hilos de rafia de plástico, sujetos al enrejillado metálico de la parte superior del invernadero. Las líneas de sacos estaban separadas 2,4 metros, y la separación entre plantas era de 0,4 m, lo que da una densidad de 1,07 plantas/m^2. La poda y entutorado se realizaba cada 7-10 días. El trasplante se realizó el 25/03/2021. A principios de junio de 2021 se retiró el plástico de la cubierta del invernadero, dejando sólo la malla en la cubierta.

Caracteres estudiados

Se estudiaron los siguientes parámetros agronómicos:

Número de ramilletes con flores abiertas y ramilletes con al menos un fruto cuajado, a los 40, 64 y 84 días del trasplante.

Producción comercial (kg/m^2), número de frutos comerciales (frutos/m^2) y peso medio de los frutos comerciales (g), considerando comerciales los frutos sin deformaciones graves y con un peso superior a 80 gramos. Los frutos se pesaban individualmente en el invernadero, con una balanza doméstica. Se realizaron 8 recolecciones, espaciadas entre 4 y 8 días, en función del ritmo de maduración, empezando el 25/06/2021 y terminando el 27/07/2021.

Diseño experimental

Se evaluó una repetición de 10 plantas de cada variedad, que no estaban situadas en los bordes. Todos los parámetros se midieron por planta individual.

Para estimar la variación de todos los parámetros estudiados a lo largo del ciclo se realizó un ANOVA multifactorial, con los factores variedad y fecha de muestreo. Para la producción comercial, frutos comerciales recolectados y peso medio de los frutos comerciales también se realizó un análisis de la varianza unifactorial, con el factor variedad. Si se encuentran diferencias significativas se aplica un contraste post-hoc LSD (*Least Significant Difference*, diferencia Mínima Significativa), para establecer la diferencia significativa entre los valores medios de cada tratamiento. Ambos análisis se realizaron con el programa STATGRAPHICS PLUS versión 3.1 para Windows.

Resultados y Discusión

En primer lugar, se muestran los resultados del ANOVA multifactorial (Tabla 1), el cual nos servirá para analizar la evolución de cada uno de los parámetros estudiados durante el cultivo.

Tabla 1. *P-value* y nivel de significación obtenido en el ANOVA multifactorial realizado para cada uno de los parámetros estudiados, considerando como factores la variedad y la fecha de recolección.

	Producción comercial	**Nº frutos**	**Peso medio del fruto**	**Nº de ramilletes**	**Nº ramilletes cuajados**
Variedad (V)	*** 0,000	*** 0,000	*** 0,000	s.d. 0,1774	s.d. 0,8771
Fecha de recolección (F)	*** 0,000	*** 0,000	*** 0,000	*** 0,000	*** 0,00
Interacción VxF	*** 0,000	*** 0,000	*** 0,000	s.d. 0,8371	s.d. 0,2067

Valores de significación: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$), s.d. (> 0,05; sin diferencia significativa)

Se encontraron diferencias significativas entre las variedades, las fechas de recolección e interacción 'VariedadxFecha' (VxF) para la producción comercial, el número de frutos y el peso medio del fruto, así como entre las fechas de recolección para el número de ramilletes y el número de ramilletes cuajados. Aunque también se esperaba encontrar diferencias notables en el número de ramilletes entre los híbridos Muchamiel y el Pera F1 (variedad comercial orientada a la productividad), estas no se observaron ni en el número de ramilletes ni en el número de ramilletes cuajados entre los tres cultivares, así como tampoco en la interacción VxF.

A continuación, analizaremos la evolución del cultivo mediante los gráficos de interacción VxF, construidos a partir de los ANOVAs multifactoriales.

En el caso de la producción comercial (Figura 1), observamos que el híbrido Pera F1 muestra un ligero crecimiento continuado a lo largo del cultivo, llegando a alcanzar casi 1 kg/m^2 en la última recolección (27 de julio). Los híbridos Muchamiel son de maduración más tardía, y podemos ver claramente la diferencia respecto del Pera F1 durante la primera fecha de recolección (25 de junio), en la cual la producción es notablemente mayor en los híbridos Muchamiel debido a la presencia de un mayor número de frutos maduros. Esto es especialmente importante en el caso del híbrido 1200x18.

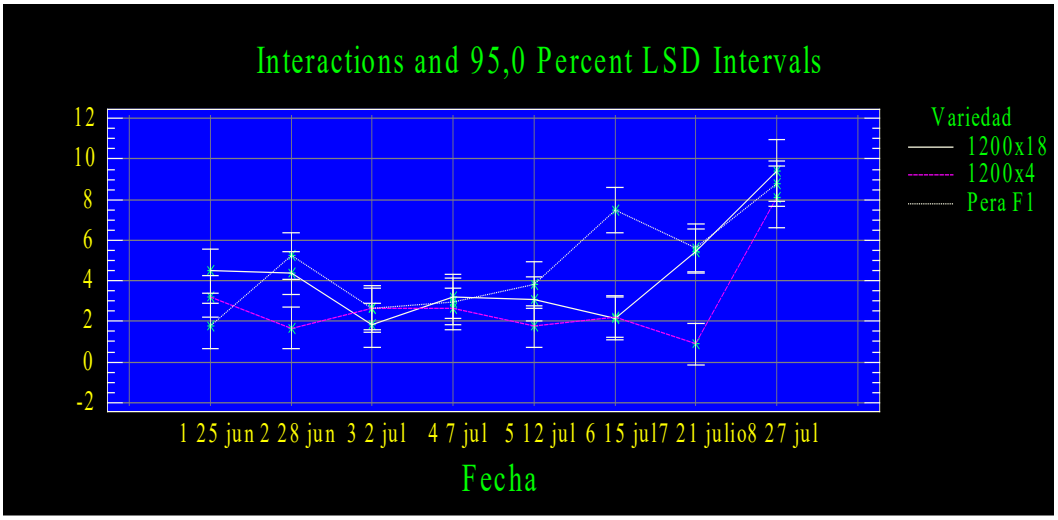


Figura 1. Gráfica de interacción VxF para la producción comercial en kg/m^2.

A partir de la segunda fecha de recolección (28 de junio), la producción presenta valores sin grandes diferencias entre los tres híbridos, siendo relativamente estable durante las siguientes cuatro recolecciones. Observamos un notable incremento de la misma durante las dos últimas recolecciones para el 1200x18, y en la última para el 1200x4. Esto se debe a que el agricultor decidió acortar el ciclo de cultivo por causas económicas, por lo que se recolectó todo el fruto remanente en la planta, estuviera o no maduro, durante las últimas fechas de recolección. Esto nos permite tener una estimación de la producción comercial total.

En cuanto al número de frutos comerciales (Figura 2), observamos que las diferencias entre los tres híbridos no son especialmente importantes durante las cinco primeras recolecciones, aunque sí apreciamos diferencias en la sexta y séptima recolección. El notable aumento en el número de frutos en la última fecha se explica de nuevo por la recolección del fruto remanente en la planta.

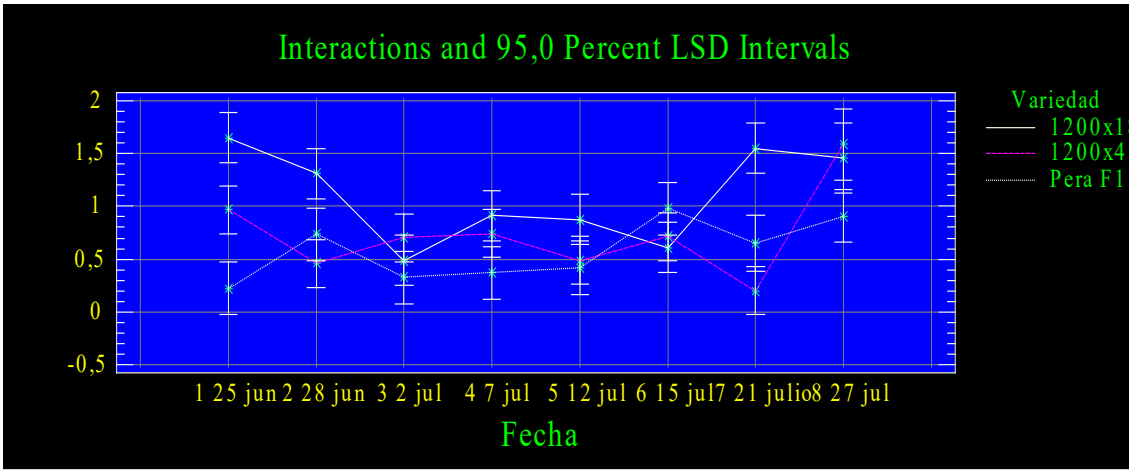


Figura 2. Gráfica de interacción VxF para el número de frutos por unidad de superficie (m^2).

El peso medio del fruto comercial fue claramente superior en los híbridos Muchamiel (Figura 3) durante la mayor parte del cultivo, mientras que el híbrido Pera F1 mostró valores menores, pero más estables. Durante las últimas fechas de recolección se observan fuertes caídas en los híbridos Muchamiel. La necesidad de recolectar todo el fruto durante las últimas fechas originó que hubiera una mayor variabilidad en cuanto al tamaño de este, recolectándose frutos de menor calibre que en las fechas anteriores. Además, la reducción natural del peso del fruto durante el final del ciclo de cultivo es una característica que ya habíamos observado en cultivares Muchamiel (sin datos publicados).

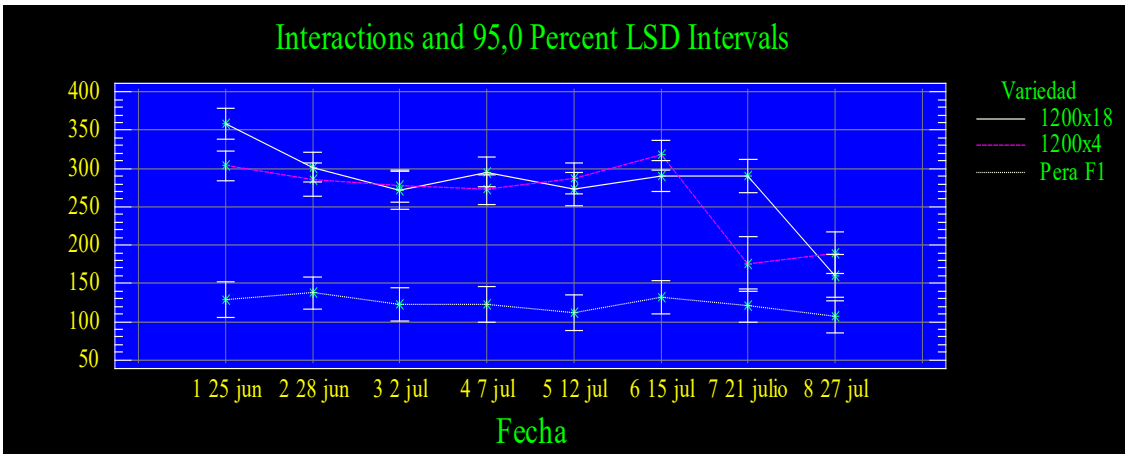


Figura 3. Gráfica de interacción VxF para el peso medio del fruto en g.

Finalmente, se realizó un ANOVA unifactorial con el factor variedad para comparar los valores medios de la producción comercial, el número de frutos y el peso medio del fruto de cada uno de los híbridos (Tabla 2). Se encontraron diferencias significativas en los tres parámetros estudiados, por lo que se efectuó un test de rango múltiple (95% LSD) para realizar las comparaciones individuales.

Existen diferencias significativas en producción entre el 1200x18 y los híbridos 1200x4 y Pera F1. Esto dos últimos no manifestaron diferencias entre sí. El híbrido 1200x4 mostró valores significativamente menores que los otros dos híbridos en el número de frutos, mientras que el peso medio fue significativamente mayor en ambos híbridos Muchamiel, tal y como ya se observaba claramente en la gráfica de interacción. Esto último no es sorprendente, pues el tomate Muchamiel suele ser apreciado por su calibre medio-alto, y este parámetro siempre ha ocupado un puesto importante en las prioridades del Programa de Mejora Genética CIAGRO-UMH.

Tabla 2. p-*value* de los ANOVA unifactoriales con la variedad como factor y test de rango múltiple (95% LSD) para la producción comercial, el nº de frutos y el peso medio del fruto.

	Producción comercial (kg/m²)		**Nº frutos/m²**		**Peso medio del fruto (g)**	
p-value	0,0004		0,0004		0,0000	
Test de rango múltipe						
	Media	Grupos	Media	Grupos	Media	Grupos
Pera F1	4,54	b	37,69	a	118,74	b
1200x4	4,99	b	18,67	b	274,37	a
1200x18	8,12	a	29,32	a	285,38	a

Este ensayo es el primero que se realiza con los híbridos UMH de tipo Muchamiel a media escala, en condiciones reales de cultivo sin suelo en invernadero, en el que se cultivaron más de 2000 plantas de cada híbrido a nivel comercial. Anteriormente, se realizaron estudios preliminares con estos híbridos en las instalaciones (invernadero de malla) del grupo de mejora del CIAGRO-UMH. En este caso el cultivo se llevó a cabo en suelo (con y sin injerto) y se analizaron los parámetros productivos totales, no los comerciales, por lo que la comparación con el presente ensayo no es óptima.

Sin embargo, podemos extraer algunos datos interesantes como que, a diferencia de lo observado en el presente ensayo, el híbrido 1200x4 mostró un mejor comportamiento tanto en producción como en número de frutos que el 1200x18 en estudios realizados en 2018 (Cámara, 2018) y 2019 (Pérez, 2019). También es muy llamativa la diferencia que existe en el peso medio de los frutos entre el presente ensayo (con tomates en torno a 280 g) y los estudios experimentales con cultivo en suelo (alrededor de 150 g), algo que será estudiado próximamente en un ensayo realizado en suelo a nivel comercial. Además, en todos los ensayos el peso medio del fruto fue similar para los dos híbridos, tanto en plantas injertadas como sin injertar.

Conclusiones

En este ensayo se ha demostrado que los híbridos Muchamiel 1200x4 y 1200x18 con resistencias a virus pueden llegar a ser una opción viable a nivel agronómico en cultivo protegido sin suelo, ya que parecen capaces de igualar el ritmo productivo e incluso de mejorar los principales parámetros agronómicos de un híbrido comercial de tipo pera orientado a la producción en estas condiciones de cultivo. Para complementar este estudio, se evaluarán próximamente los parámetros de calidad del fruto dentro de este mismo ensayo, lo cual nos dará una información más completa, y también se analizarán los datos procedentes de otros estudios realizados a nivel comercial con estos híbridos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Ayuntamiento de Mutxamel, mediante el contrato "Seguimiento y evaluación agronómica y de calidad de 3 ensayos de tomate Muchamiel en el término municipal de Mutxamel durante el ciclo de primavera-verano 2021", firmado con el CIAGRO-UMH. Los autores agradecen a Álvaro Montón y a A.E.P.S.A. por el cultivo realizado.

Bibliografía

Cámara B., 2019. Evaluación de híbridos de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) Muchamiel con resistencia a virus. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández, Orihuela.

Capobianco-Uriarte, M., Aparicio, J., De Pablo-Valenciano, J., 2017. Analysis of Spain's competitiveness in the European tomato market: An application of the Constant Market Share method. Spanish Journal of Agricultural Research, 15(3). https://doi.org/10.5424/sjar/2017153-10629

Carbonell, P., (2021). Programa de mejora genética de tomate tradicional UMH: nuevas técnicas moleculares, registro de líneas y agricultura de resiliencia. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández, Orihuela. https://www.educacion.gob.es/teseo/mostrarRef.do?ref=1980309

Cebolla-Cornejo, J., Soler, S., Nuez, F., 2007. Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case Study. International Journal of Plant Production, 1(2), 113-128. https://doi.org/10.22069/ijpp.2012.531

Martinez-Carrasco, L., Brugarolas, M., Martinez, A., Ros, M. del M., y Ruiz, J.J., 2014. Factores determinantes del precio de los tomates de variedades tradicionales: un analisis de precios hedonicos. Economia Agraria y Recursos Naturales, 14(2), 81-95. https://doi.org/10.7201/earn.2014.02.04

Nicasio, J.J., 2017. Las figuras de calidad Agroalimentaria diferenciadas como herramientas para un desarrollo rural sostenible. En Soler, S., Figás, M.R., Prohens, J. (Editores). I Congrés de la Tomaca Valenciana: la Tomaca Valenciana d'El Perelló. UPV. https://doi.org/10.4995/TOMAVAL2017.2017.6395

Pérez-Mesa, J. C., 2009. Should Almería (Spain) have to be worried, thinking that their tomato export is currently affected by international competition? En: K. Mattas & editor (Eds.), Agricultural Economics Review (Vol. 08, Número 2). https://doi.org/10.22004/ag.econ.178229

Pérez, S., 2020. Estudio de líneas de tomate Muchamiel derivadas del programa de mejora genética de variedades tradicionales de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) de la EPSO-UMH injertadas en dos patrones comerciales. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández, Orihuela.

Ruiz, J., García-Martínez, S., 2009. Tomato varieties «Muchamiel» and «De la pera» from the southeast of Spain: Genetic improvement to promote on-farm conservation. Biodiversity Technical Bulletin, 15, 171-176.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Introducción del gen *Ty-2* en el Programa de Mejora Genética de Variedades Tradicionales de Tomate del CIAGRO-UMH

J.A. Cabrera, P. Carbonell, J.F. Salinas, A. Grau, A. Alonso, S. García-Martínez, J.J. Ruiz

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO), EPSO (UMH) Carretera de Beniel Km 3.2 Orihuela (Alicante). E-mail: sgarcia@umh.es

Resumen

Un conjunto de virus incluidos en el género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*) son los responsables del virus de la cuchara (TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*), siendo el agente vector del virus la mosca blanca, *Bemisia tabaci* Gennadius. El TYLCV se distribuye por todo el mundo causando pérdidas de hasta del 100%, por lo que es un virus muy a tener en cuenta tanto en cultivos bajo invernadero como al aire libre, más acentuado al aire libre. Aunque se describió por primera vez en Israel en el 1939, distribuyéndose por todo el mundo y detectado en España en el 1992 en invernaderos de Murcia y Almería, aun no se han conseguido materiales con alta y homogénea respuesta a la infección del virus, al contrario de lo que ha sucedido con otros como en el caso del ToMV, donde la resistencia proporcionada por el gen *Tm-2*^{2} es total. Mediante la utilización de cultivares con resistencias, prácticas culturales y métodos físicos, químicos y biológicos, para el control del vector transmisor, principalmente se combate el TYLCV. Puesto que el virus es un inconveniente para el cultivo tanto de variedades comerciales como de variedades tradicionales, y las medidas preventivas y las medidas dirigidas a controlar las poblaciones de *Bemisia tabaci* no son del todo efectivas, la resistencia genética es la mejor estrategia de lucha a largo plazo contra la enfermedad. Una de las alternativas es la piramidalización asistida por marcadores moleculares para obtener mayores niveles de resistencia a través de una combinación de genes, lo que proporcionará además de una resistencia efectiva, una resistencia duradera en el tiempo, puesto que el virus encontrará más barreras para superar la resistencia e infectar la planta. El grupo de Biodiversidad Agrícola y Mejora Genética de Variedades del CIAGRO-UMH (Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental de la Universidad Miguel Hernández) empezó en 1998 la introducción de resistencia genética a virus en variedades tradicionales de tomate, entre ellos a TYLCV, mediante retrocruzamiento asistido por marcadores moleculares. Tras la introducción de los genes *Ty-1* y *ty-5* (dominante y recesivo, respectivamente), a principios de 2021 se empezó la introducción del gen *Ty-2* (dominante) en un conjunto de líneas de mejora de tomate Muchamiel y De la pera. Para poder realizar la selección asistida por marcadores, se deberá realizar la búsqueda y puesta a punto de los mismos. Se han seleccionado marcadores CAPS ya descritos y se han transformado para poder visualizarlos mediante la técnica HRM (High Resolution Melting).

Palabras clave: TYLCV, piramidalización, resistencia genética, *Ty-1*, *Ty-2*, *ty-5*, HRM.

Introduction of the *Ty-2* gene in the CIAGRO-UMH Tomato Breeding Programme for Traditional Tomato Varieties

Abstract

A group of viruses included in the genus Begomovirus (family Geminiviridae) are responsible for the *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), the virus vector agent being the whitefly, Bemisia tabaci Gennadius. TYLCV is distributed worldwide causing losses of up to 100%, making it a virus to be taken into account in both greenhouse and outdoor crops, more pronounced in the open air. Although it was described for the first time in Israel in 1939, it has been distributed all over the world and was detected in Spain in 1992 in greenhouses in Murcia and Almeria, materials with a high and homogeneous response to virus infection have not yet been obtained, contrary to what has happened with others, as in the case of ToMV, where the resistance provided by the *Tm-2*^{2} gene is total. TYLCV is mainly controlled by using resistant cultivars, cultural practices and physical, chemical and biological methods to control the transmitting vector. Since the virus is a drawback for the cultivation of both commercial and traditional varieties, and preventive measures and measures aimed at controlling Bemisia tabaci populations are not entirely effective, genetic resistance is the best strategy for long-

term control of the disease. One of the alternatives is molecular marker-assisted pyramiding to obtain higher levels of resistance through a combination of genes, which will provide not only effective resistance, but also long-lasting resistance over time, as the virus will find more barriers to overcome resistance and infect the plant. The Agricultural Biodiversity and Varietal Breeding group of CIAGRO-UMH (Centre for Agri-food and Agri-environmental Research and Innovation of the Miguel Hernández University) started in 1998 the introduction of genetic resistance to viruses in traditional tomato varieties, including TYLCV, by means of backcrossing assisted by molecular markers. After the introduction of the *Ty-1* and *Ty-5* genes (dominant and recessive, respectively), the introduction of the *Ty-2* gene (dominant) in a set of breeding lines of Muchamiel and De la pera tomato started at the beginning of 2021. In order to be able to carry out marker-assisted selection, the markers will have to be searched for and fine-tuned. CAPS markers already described have been selected and transformed in order to visualise them using the HRM (High Resolution Melting) technique.

Keywords: TYLCV, pyramiding, genetic resistance, *Ty-1*, *Ty-2*, *ty-5*, HRM.

Introducción y/o Justificación

Un conjunto de virus incluidos en el género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*) son los responsables del virus de la cuchara (TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*), siendo el agente vector del virus la mosca blanca, *Bemisia tabaci* Gennadius (Cohen y Harpaz, 1964). Los síntomas muestran enanismo, fruncimiento de las hojas hacia arriba, aclaramiento de venas, ramificación excesiva y retraso del crecimiento, todo ello asociado a síntomas de mosaico de leves a graves y a una esterilidad parcial o total de las plantas (Vasudeva y Sam Raj, 1948). El virus infecta dicotiledóneas, principalmente solanáceas, y causa graves problemas en los cultivos de tomate en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, incluso arrasando cosechas enteras (Picó et al., 1996). En España se detectó por primera vez en 1992 en invernaderos de Murcia (Moriones et al., 1993) y Almería (Reina et al., 1994), perteneciendo a la especie procedente de Cerdeña (*Tomato yellow leaf curl Sardina virus*, TYLCSV). Cinco años más tarde tras episodios más graves, se detecta la presencia de la especie *Tomato yellow leaf curl virus* en 1997 (Navas-Castillo et al., 1997).

La introducción de alelos de resistencia al TYLCV en el tomate cultivado procedentes de las especies silvestres comenzó en 1974 (Pilowsky y Cohen, 1990) y fue completada con éxito por varios investigadores (Friedmann et al., 1998; Kalloo y Banerjee, 1990; Kasrawi et al., 1988; Laterrot, 1992; Scott et al., 1995; Vidavsky y Czosnek, 1998; Zamir et al., 1994, citado en Hanson et al., 2000). Un gen dominante de tolerancia al TYLCV, el *Ty-1*, fue encontrado en la accesión LA1969 de L. chilense (Zamir et al., 1994). En la India, Kalloo y Banerjee (1990) desarrollaron seis líneas de tomate con el gen *Ty-2,* tolerantes al TYLCV con resistencia derivada de *L. hirsutum* f. *glabratum* accesión 'B 6013'. Una de estas líneas fue la H24, mostrando una excelente tolerancia al TYLCV. Otra línea con el gen *Ty-2* es la CLN2116B, procedente de Taiwan y desarrollada por el AVRDC (Dueñas et al., 2008).

Actualmente el TYLCV sigue siendo un inconveniente para el cultivo tanto de variedades comerciales como de variedades tradicionales, y debido a que las medidas preventivas y las medidas dirigidas a controlar las poblaciones de *Bemisia tabaci* no son del todo efectivas, la resistencia genética es la mejor estrategia de lucha a largo plazo contra la enfermedad. Además, de los genes citados anteriormente se han descrito otras fuentes de resistencia a TYLCV (Tabla 1), como son los genes *Ty-3*, *Ty-4*, *ty-5* y *Ty-6.* El *Ty-1* es utilizado en programas de mejora a nivel mundial al ser un gen que ofrece un nivel elevado de tolerancia, aunque no presenta resistencia completa y en condiciones de infección fuerte la mayoría de los cultivares acaban expresando los síntomas (Pérez de Castro, 2007). Para intentar superar este inconveniente una alternativa es la piramidalización asistida por marcadores moleculares para obtener mayores niveles de resistencia a través de una combinación de genes, lo que proporcionará además de una resistencia efectiva, una resistencia duradera en el tiempo, puesto que el virus encontrará más barreras para superar la resistencia e infectar la planta.

Tabla 1. Locis de resistencia al TYLCV identificados en las especies silvestres.

Gen	Accesión	Especie	Cromosoma	Referencia
Ty-1	LA1969	*S. chilense*	6	Zamir et al. (1994)
Ty-2	B6013	*S. habrochaites*	11	Hanson et al. (2006)
Ty-3	LA1932, LA2779	*S. chilense*	6	Ji et al. (2007)
Ty-4	LA1932	*S. chilense*	3	Ji et al. (2009)
Ty-5	TY172	*S. peruvianum*	4	Anbinder et al. (2009)
Ty-6	LA1938	*S. chilense*	10	Scott y Hutton (2015)

En el programa de mejora genética de variedades del CIAGRO-UMH se desarrollaron varias líneas de mejora con distintas combinaciones en homocigosis para los genes *Tm-2*^{2}, *Ty-1* y *Sw-5,* que confieren resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV respectivamente. En septiembre de 2017, en las líneas UMH1139, UMH1200, UMH1354, UMH1422 y UMH1406 se comenzó la introgresión del gen *ty-5* para complementar la resistencia genética a TYLCV, obteniendo la semilla en homocigosis mediante la autofecundación de retrocruces de quinta generación en febrero de 2021. Finalizada la introgresión del gen *ty*-5 se decidió introducir el gen *Ty-2* con el objetivo de obtener líneas con los genes *Ty-1, ty-5 y Ty-2* para aumentar la resistencia genética a TYLCV. En marzo de 2021 se realizaron los cruces de parentales entre las líneas UMH1200+*ty-5* y UMH1406+*ty-5* y las líneas H24 y CLN2116B (portadoras del gen *Ty-2*, y cedidas por el COMAV-UPV) para la obtención de la generación F1. Se continuará cruzando por el parental recurrente hasta obtener el quinto o sexto retrocruce. El presente trabajo muestra la búsqueda y puesta a punto de marcadores para su visualización e interpretación mediante la técnica HRM para así, poder realizar la selección asistida por marcadores moleculares permitiendo seleccionar la descendencia heterocigota precozmente en cada generación de retrocruces.

Materiales y métodos

Material vegetal

La resistencia al TYLCV que presentan las líneas H24 y CLN2116B es originaria de la especie silvestre *L. hirsutum* f. *glabratum*, accesión B6013 (Kalloo y Banerjee, 1990). La línea H24 proviene de una población con cuatro retrocruces y dos autofecundaciones a partir del cruzamiento entre la accesión B6013 (parental donante, el resistente) y la variedad comercial india Hisar Arun (parental recurrente, el sensible) (Kalloo y Banerjee, 1990; Kalloo y Bhutani, 1993, citado en Hanson et al., 2000). El país de procedencia de la CLN2116B es Taiwan, y fue desarrollada por el Asian Vegetable Research and Development Center, siendo una línea con siete generaciones de autofecundaciones (Dueñas et al., 2008; Yan et al., 2018).

Para la obtención de la F1, como parentales recurrentes se ha utilizado dos líneas mejoradas, una Muchamiel y otra De la pera, obtenidas en el Programa de Mejora Genética del CIAGRO-UMH. La línea UMH1200+*ty-5* es del tipo Muchamiel y la UMH1406+*ty-5* del tipo De la pera, portadoras de 4 genes en homocigosis. Como parentales donantes del *Ty-2* se han utilizado las líneas de mejora H24 y CLN2116B, suministradas por el Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia (COMAV-UPV). En la tabla 2 aparecen las líneas utilizadas y su genotipo para los distintos genes de resistencia a virus.

Tabla 2. Material vegetal utilizado. Líneas con su genotipo para los distintos genes de resistencia a virus.

Tipo	Línea	Genotipo				
		ty-5	***Tm-2^a***	***Ty-1***	***Sw-5***	***Ty-2***
Muchamiel	UMH1200 + *ty-5*	rr	RR	RR	RR	ss
De la pera	UMH1406 + *ty-5*	rr	RR	RR	RR	ss
Línea de mejora	H24	SS	ss	ss	ss	RR
Línea de mejora	CLN2116B	SS	ss	ss	ss	RR

rr: resistencia en homocigosis recesiva; RR: resistencia en homocigosis dominante; SS: sensibilidad en homocigosis dominante; ss: sensibilidad en homocigosis recesiva.

Cultivo de plantas

Los parentales se cultivaron en un invernadero situado en las instalaciones de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (Universidad Miguel Hernández de Elche), en Desamparados (Orihuela, Alicante), en el ciclo de primavera-verano sobre cultivo sin suelo en sustrato de perlita.

Resultados

Diseño de cebadores

El primer mapeo de resistencia al TYLCV en el cromosoma 11 demuestra una introgresión con una distancia genética de 19 cM entre los marcadores TG-36 (posición en el mapa, 84 cM) y TG-393 (103 cM) (Hanson et al., 2000). Más tarde, Hanson et al. (2006) mostraron una nueva acotación de la región resistente, reduciéndola, entre los marcadores TG-36 y TG-26 (92 cM). Ji et al. (2009) mapearon con mayor precisión la región de introgresión, situándola en un intervalo de 4,5 cM, entre los marcadores C2_At1g07960 (82,5 cM) y cLEN-11-F24 (87 cM). Recientemente se han descrito otros marcadores entre las posiciones físicas 54.272 kb y 54.538 kb (Yamaguchi et al., 2018), pero al no ser públicas sus secuencias, se utilizan 3 marcadores CAPS (Tabla 3) publicados con anterioridad, TG-36, T0386A y cLEN-11-F24. Para el diseño de los cebadores se ha reducido la región amplificada de los marcadores CAPS, de esta forma se realiza la transformación de dichos marcadores para poder visualizarlos en HRM. Se han seleccionado 10 cebadores entre los tres marcadores y se seleccionará uno de ellos para la identificación del gen *Ty-2*.

Tabla 3. Marcadores CAPS próximos al gen Ty-2 en el cromosoma 11. Adaptado de Ji et al. (2009).

Marcador	Posición (cM)	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Encima de restricción	Referencia
TG36	84	F:AACCACCACAAGAAAGATCCC R: TCCTGAAATGGAAGATTGCC	*Rsa*I	Schmitz et al. (2002)
T0386A	85	F:ATGCTGATGAAAGATTGGGCGCTG R: TTAGGCTTTGGCTTCTCGACCACT	*Hinf*I	Ji et al. (2009)
cLEN-11-F24	87	F:TTATGGACAGCATGGTCCTCGGAA R: GAAGTCTGGGAGCGATAGTAGTCT	*Mnl*I	Ji et al. (2009)

Tabla 4. Secuencias de los cebadores diseñados a partir de CAPS para su visualización en HRM.

Marcador	Posición (kb)	Secuencia de los cebadores (5'-3')[a]	Fragmento amplificado (pb)
TG36	54,407[b]	F: ACCACCACAAGAAAGATCCCT R: GACCGGAAAGAATCCGTCGT	121
		F: AGATCCCTCCAGGTATAAGGCA R: AGACCGGAAAGAATCCGTCG	109
		F: CACAAGAAAGATCCCTCCAGGT R: AGAATCCGTCGTTGTGGAGG	108
T0386A	54,419[b]	F: GCAAGGCACATCTTGTCACC R: GGTAGCCCCAGCATCTTTGA	173
		F: GGCACATCTTGTCACCTTGG R: CGCGATGACAGACCAATACG	73
		F: CTGCAAGGCACATCTTGTCAC R: GGTGAAGGAAGCCGAATGGG	112
cLEN-11-F24	54,465[b]	F: AATCTGCCAAACGACCCCTT R: TGCTGAGCAGGTGACATCAA	100
		F: ATCTGCCAAACGACCCCTTA R: CTTGCTGAGCAGGTGACATC	101
		F: AATCTGCCAAACGACCCCTTA R: GAGCAGGTGACATCAACAAGC	96
		F: ATACAATCTGCCAAACGACCC R: CTGAGCAGGTGACATCAACAAG	102

[a]Secuencias obtenidas mediante Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). [b]Posición física de los marcadores en el mapa (Yamaguchi et al., 2018).

Conclusiones

Se han seleccionado un total de 10 cebadores, tres para el marcador TG36, tres para el T0386A y cuatro para el cLEN-11-F24, los cuales se pondrán a punto y se seleccionará el que mejor funcione. El cebador seleccionado se utilizará como marcador para identificar el gen *Ty-2* en el programa de mejora del CIAGRO-UMH.

Con la piramidalización asistida por marcadores moleculares se pueden obtener materiales vegetales que ofrezcan una resistencia más efectiva y duradera en el tiempo, facilitando el manejo del cultivo de variedades tradicionales y comerciales, tanto al aire libre como en invernadero. Esta estrategia, utilizando una combinación de genes, proporciona mayores niveles de resistencia y el virus encontrará más barreras para superar la resistencia e infectar la planta.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia (COMAV-UPV) la cesión de las dos líneas de mejora, H24 y CLN2116B.

Bibliografía

Anbinder I, Reuveni M, Azari R, Paran I, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Lapidot M, Levin I. 2009. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. Theor. Appl. Genet. 119: 519–530.

Cohen S, Harpaz I. 1964. Periodic, rather than continual adquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). Entomologia Experimentalis et Applicata 7: 155-166.

Dueñas F, Martínez Y, Álvarez M, Moya C, Peteira B, Arias Y, Diez MJ, Hanson P, Shagarodsky T. 2008. Caracterización agromorfológica y evaluación de la resistencia al TYLCV en nuevos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* l.) como apoyo al programa de mejoramiento genético de la hortaliza para la enfermedad Cultivos Tropicales 29: 53-60.

Friedmann M, Lapidot M, Cohen S, Pilowsky M. 1998. A novel source of resistance to Tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. Journal of the American Society for Horticultural Science 123: 1004-1007.

Hanson PM, Bernacchi D, Green S, Tanksley S.D, Muniyappa V, Padmaja AS, Chen H, Kuo G, Fang D, Chen J. 2000. Mapping a wild tomato introgression asociated with Tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. Journal of the American Society for Horticultural Science 125: 15-20.

Hanson PM, Green SK, Kuo G. 2006. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. Report of the Tomato Genetics Cooperative 56: 17-18.

Ji Y, Schuster DJ, Scott JW. 2007a. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. Molecular Breeding 20: 271-284.

Ji Y, Scott JW, Schuster DJ. 2009. Toward fine mapping of the Tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. Journal of the American Society for Horticultural Science 44.3: 614-618.

Kalloo G, Banerjee MK. 1990. Transfer of tomato leaf curl virus resistance from *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *L. esculentum*. Plant Breeding 105: 156-159.

Kalloo, G. and R.D. Bhutani. 1993. Improvement of tomato, p. 45–68. In: K.L. Chadha and G. Kalloo (eds.). Advances in horticulture. vol. 5. Vegetable crops. Malhotra Publishing House, New Delhi, India.

Kasrawi MA, Suwwan MA, Mansour A. 1988. Sources of resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Lycopersicon species. Euphytica 37: 61-64.

Laterrot, H. 1992. Resistance genitors to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). Tomato Leaf Curl Nswl. 1:2–4.

Moriones E, Arnó J, Accotto GP, Noris E, Cavallarin L. 1993. First report of Tomato yellow leaf curl virus in Spain. Plant Disease 77: 953.

Navas-Castillo J, Sanchez-Campos S, Díaz JA, Sáez-Alonso E, Moriones E. 1997. First report of Tomato yellow leaf curl virus-Is in Spain: Coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. Plant Disease 81: 1461.

Pérez de Castro A. 2007. Mejora genética para la resistencia a los geminivirus Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) y Tomato yellow leaf curl Sardina virus (TYLCSV) en tomate. Tesis doctoral.

Picó, B., M.J. Díez, and F. Nuez. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus-A review. Scientia Hort. 67:151–196.

Pilowsky M, Cohen S. 1990. Tolerance to Tomato yellow leaf curl virus derived from *L. peruvianum*. Plant Disease 74: 248-250.

Reina J, Jiménez J, Bejarano ER, Guerra JM, Cuadrado IM, García C. 1994. El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). Hortofruticultura 6: 36-40.

Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F, and Theres K. 2002. The tomato blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 1064–1069.

Scott JW, Hutton SF. 2015. Fla. 8638B and Fla. 8624 tomato breeding lines with begomovirus resistance genes *ty-5* plus *Ty-6* and *Ty-6*, respectively. Journal of the American Society for Horticultural Science 50.9: 1405-1407.

Scott JW, Stevens MR, Barten JHM, Thome CR, Polston JE, Schuster DJ, Serra CA. 1996. Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato. En: D. Gerling y R.T. Mayer (Eds.) Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage Control and Management. Intercept Ltd. Andover, 357-367.

Vasudeva RS, Sam Raj J. 1948. A leaf curl disease of tomato. Phytopatology 38: 364-369.

Vidavsky F, Czosnek H. 1998. Tomato breeding lines resistant and tolerant to Tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. Phytopatology 88: 910- 914.

Yamaguchi H, Ohnishi J, Saito A, Ohyama A, Nunome T, Miyatake K, Fukuoka H. 2018. An NB-LRR gene, TYNBS1, is responsible for resistance mediated by the *Ty- 2* Begomovirus resistance locus of tomato. Theor. Appl. Genet. 131: 1345–1362.

Yan Z, Pérez-de-Castro A, Díez MJ, Hutton SF, Visser RGF, Wolters A-MA, Bai Y. Li J. 2018. Resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomato germplasm. Front. Plant Sci. 9: 1198.

Zamir D, Michelson IE, Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, van Oss H, Kedar N, Rabinowitch HD, Czosnek H. 1994. Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. Theoretical and Applied Genetics 88: 141-146.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Seguimiento de ensayos de tomate tipo Muchamiel con resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV en el término municipal de Mutxamel durante el ciclo de primavera-verano

S. García-Martínez[1], J.M. Sánchez[1], A. Gómez[1], A. Baptista[1], F. Hernández[1], M. Juárez[1], P. Guirao[2], A.M. Ortega[2], L. Noguera-Artiaga[1], A. Alonso[1], J.J. Ruiz[1]

[1] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO), EPSO (UMH) Carretera de Beniel Km 3.2 Orihuela (Alicante). E-mail: sgarcia@umh.es
[2] Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, EPSO (UMH) Carretera de Beniel Km 3.2 Orihuela (Alicante).

Resumen

En 2017, el Ayuntamiento de Mutxamel, Jóvenes Agricultores Alicante-ASAJA y la Universidad Miguel Hernández empezaron el proceso para solicitar la Marca de Calidad CV Tomate Muchamiel. Fruto de estos esfuerzos, en 2019 nace la Asociación de Productores y Comercializadores de Tomate Muchamiel en la localidad de Mutxamel (Alicante), con la "vocación de representar, defender y promocionar la producción y comercialización del tomate Muchamiel. Entre sus primeros objetivos está la realización de las gestiones oportunas para la creación de la marca de calidad CV, la cual se prevé que se conceda a mediados de 2021. A principios de 2021 el Ayuntamiento de Mutxamel firmó un contrato con la Universidad Miguel Hernández para realizar el seguimiento y la evaluación agronómica y de calidad de 3 ensayos de tomate Muchamiel con resistencia a virus en el término municipal de Mutxamel durante el ciclo de primavera-verano 2021. En este trabajo se presenta el seguimiento y la evaluación agronómica de los 3 ensayos, haciendo hincapié en la aparición de ramilletes, el cuajado de frutos y la recolección de los mismos.

Palabras clave: Marca de Calidad CV Tomate Muchamiel

Monitoring of trials of Muchamiel tomato with ToMV, TYLCV and TSWV resistance in the town of Mutxamel during the spring-summer cycle

Abstract

In 2017, the Mutxamel City Council, ASAJA-Alicante and the Miguel Hernández University began the process to apply for the CV Tomate Muchamiel Quality Brand. As a result of these efforts, in 2019 the Muchamiel Tomato Producers and Marketers Association was born in the town of Mutxamel (Alicante), with the "vocation of representing, defending and promoting the production and marketing of Muchamiel tomato". Among its first objectives is to take the appropriate steps to create the CV quality brand, which is expected to be awarded in mid-2021. At the beginning of 2021, the Mutxamel City Council signed a contract with the Miguel Hernández University to carry out the monitoring and agronomic and quality evaluation of 3 trials of Muchamiel tomato with virus resistance in the town of Mutxamel during the spring-summer cycle 2021. In this work, the monitoring and agronomic evaluation of the 3 trials is presented, emphasizing the appearance of clusters, the fruit setting and the collection of the same.

Keywords: Quality Brand CV Tomate Muchamiel

Introducción y/o Justificación

En el sureste de España existen diversas variedades tradicionales de tomate, como el "Muchamiel" de Alicante, el "Tres cascos" de Elche, el "De la Pera" de la Vega Baja del Segura, también en Alicante, el "Valenciano", los "tomates morunos", o el "Flor de Baladre" de Murcia.

Las variedades tradicionales de tomate suelen tener unas excelentes características organolépticas (sabor, jugosidad, aroma, textura, etc.) suelen ser sensibles a la mayor parte de las virosis que afectan al tomate, lo que hace prácticamente imposible su cultivo, favoreciendo un progresivo abandono de su cultivo y sustitución por otras variedades modernas, en su mayoría híbridos F1 (Nuez *et al*., 1998). Por razones económicas, la mejora de estas variedades con un limitado mercado queda fuera de los programas de las empresas productoras de semillas, por lo que debe ser abordada preferentemente por organismos públicos (Nuez y Ruiz, 1999).

En 1998, en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández, empezó un programa de mejora de variedades tradicionales de tomate para la introducción de genes de resistencia a tres de las virosis más importantes que afectaban al cultivo del tomate en el sureste español. Estas virosis incluyen el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) y el virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV). Existen otras virosis, como el mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) o el "Torrao" o "Cribado" (*Tomato torrado virus*, ToTV), pero no se disponía de fuentes de resistencia efectivas, por lo que no se pudo plantear su introducción. En 2011 empezó la tramitación para la inscripción en el Registro de Variedades Protegidas de las primeras obtenciones, que se materializaron en 2013. Actualmente se dispone de 11 líneas de mejora y 3 híbridos comerciales registrados, de los tipos Muchamiel, De la pera y Cherry, con resistencia genética a virus.

En 2017, el Ayuntamiento de Mutxamel, la Universidad Miguel Hernández y ASAJA-Alicante empezaron el proceso para solicitar la Marca de Calidad CV Tomate Muchamiel. Fruto de estos esfuerzos, en 2019 nació la Asociación de Productores y Comercializadores de Tomate Muchamiel en la localidad de Mutxamel (Alicante), con la "vocación de representar, defender y promocionar la producción y comercialización del tomate Muchamiel. Entre sus primeros objetivos está la realización de las gestiones oportunas para la creación de la marca de calidad CV Tomate Muchamiel, la cual se prevé que se conceda antes de finalizar el año 2021. Las marcas colectivas y de garantía, entre las que se encuentra la Marca de Calidad CV, es una de las formas de diferenciación más interesantes para los productores, en especial para los de pequeño tamaño (Nicasio, 2017).

A principios de 2021 el Ayuntamiento de Mutxamel firmó un contrato con la Universidad Miguel Hernández para realizar el seguimiento y la evaluación agronómica y de calidad de 3 ensayos de tomate Muchamiel con resistencia a virus en el término municipal de Mutxamel durante el ciclo de primavera-verano 2021.

En este trabajo se presenta el seguimiento y la evaluación agronómica de dos ensayos de tomate tipo Muchamiel con resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV durante el ciclo de primavera-verano, haciendo hincapié en la aparición de ramilletes, el cuajado de frutos y la recolección de los mismos.

Material y Métodos

Material vegetal

En este trabajo se han estudiado varios híbridos Muchamiel, obtenidos en el Programa de Mejora Genética del CIAGRO-UMH, todos con resistencia en heterocigosis a ToMV, TYLCV y TSWV, obtenidos en el Programa de Mejora Genética de Tomate del CIAGRO-UMH. Estos híbridos se obtuvieron cruzando las líneas de mejora UMH1200 y 168T, con resistencia en homicigosis a los 3 virus citados, y las variedades tradicionales Muchamiel4 y Muchamiel18. En uno de los ensayos se incluyó la variedad tradicional Mercalicante.

Tabla 1. Variedades estudiadas en este trabajo

Ensayo	Condiciones cultivo	Variedad	Plantas	Tipo	Resistencia a virus
1	Convencional	UMH1200x4	600	Híbrido	ToMV, TSWV, TYLCV
		UMH1200x18	600	Híbrido	ToMV, TSWV, TYLCV
2	Ecológico	168TTx4	150	Híbrido	ToMV, TSWV, TYLCV
		168TTx18	150	Híbrido	ToMV, TSWV, TYLCV
		Mercalicante	150	Tradicional	Ninguna

Condiciones de cultivo

En este trabajo se presentan los resultados de 2 ensayos distintos, realizados los 2 en invernadero de malla, en suelo, con riego por goteo, en las explotaciones comerciales de 2 agricultores profesionales, localizadas en el término municipal de Mutxamel (Alicante)

En el ensayo 1, en condiciones de cultivo convencionales, las plantas se cultivaron sin injertar (conducidas a un tallo), mientras que en el ensayo 2, en condiciones de agricultura ecológica, se cultivaron injertadas en el patrón comercial Beaufort (De Ruiter), y conducidas a dos tallos. La poda y entutorado se realizaba cada 7-10 días. Las principales características de cada cultivo, así como las fechas de las labores más importantes, se detallan en la Tabla 2. En ambos casos se utilizaron colmenas de abejorros para mejorar la polinización y cuajado.

Tabla 2. Variedades estudiadas en este trabajo

Tarea	Ensayo 1	Ensayo 2
Semillero	27-01-2021	29-12-2020
Trasplante	31-03-2021	27-02-2021
Densidad (plantas/m^2)	1,67	1,11
Acolchado con plástico negro	No	Sí, cada 2 calles
Inicio recolección	25-06-2021	18-06-2021
Final recolección	25-08-2021	04-08-2021
Número de recolecciones	12	7

Caracteres estudiados

En este trabajo se estudiaron los siguientes parámetros agronómicos:

Número de ramilletes con flores abiertas y ramilletes con al menos un fruto cuajado, medidos 3 veces a lo largo del cultivo: a los 61, 79 y 98 días desde el trasplante en el ensayo 1 y a los 69, 93 y 111 días en el ensayo 2.

Producción comercial, número de frutos comerciales recolectados y peso medio de los frutos comerciales, considerando comerciales los frutos sin deformaciones graves y con un peso superior a 80 gramos. Los frutos se pesaban individualmente en el invernadero, con una balanza doméstica. Las recolecciones se realizaron espaciadas entre 4 y 8 días, en función del ritmo de maduración. Utilizando la densidad de plantación se calcularon los valores por unidad de superficie (m^2).

Diseño experimental

En el ensayo 1 se estudiaron dos repeticiones de 10 plantas de cada híbrido. En el ensayo 2 se estudió una repetición de 6-7 plantas de cada variedad. En ambos ensayos, las plantas no estaban situadas en los bordes. Todos los parámetros se midieron por planta individual en el ensayo 1 y por tallo en el ensayo 2.

Para estimar la variación de los parámetros a lo largo del ciclo se realizó un análisis multifactorial, con los factores variedad y fecha de muestreo, tanto para el conteo de ramilletes y para las recolecciones. Para la producción comercial, frutos comerciales recolectados y peso medio de los frutos comerciales al final del cultivo también se realizó un análisis de la varianza unifactorial con el factor variedad. Si

se encuentran diferencias significativas se aplica un contraste post-hoc LSD (Least Significant Difference, diferencia Mínima Significativa), para establecer la diferencia significativa entre los valores medios de cada tratamiento. Ambos análisis se realizaron con el programa STATGRAPHICS PLUS versión 3.1 para Windows.

Resultados y Discusión

Ensayo 1

En primer lugar, analizamos la evolución de los parámetros estudiados a lo largo del cultivo, mediante el ANOVA multifactorial realizado (Tabla 3). No se han encontrado diferencias significativas entre los 2 híbridos para ninguno de los caracteres estudiados, al contrario que para las distintas fechas de recolección, para las que se han encontrado diferencias significativas en todos los parámetros. La interacción entre los factores no ha sido significativa para ninguno de los parámetros

Tabla 3. *P-value* y nivel de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial realizado para cada uno de los parámetros estudiados, considerando como factores la variedad y la fecha de recolección.

	Nº de ramilletes	Nº ramilletes cuajados	Producción comercial	Nº frutos recolectados	Peso medio del fruto
Variedad (V)	0,2273 n.s.	0,9798 n.s.	0,5703 n.s.	0,1402 n.s.	0,1523 n.s.
Fecha de recolección (F)	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***
Interacción VxF	0,5954 n.s.	0,9974 n.s.	0,1719 n.s.	0,3174 n.s.	0,4939 n.s.

Valores de significación: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$), n.s. (> 0,05; sin diferencia significativa)

Por lo que se refiere a la evolución de los ramilletes y de los ramilletes cuajados a lo largo del cultivo (Tabla 4), no se han encontrado diferencias significativas entre los dos híbridos. Los dos híbridos son muy parecidos, por lo que este resultado es el esperado. Como se esperaba, el número de ramilletes y de ramilletes cuajados ha ido aumentando a lo largo del cultivo.

Tabla 4. Test de rango múltiple LSD para el número de ramilletes y de ramilletes con frutos cuajados de los dos híbridos los tres muestreos.

	Nº de ramilletes por planta	Nº ramilletes cuajados por planta
UMH1200x4	6,15 A	4,29 A
UMH1200x18	6,33 A	4,30 A
61 DDT	4,36 A	2,89 A
79 DDT	6,04 B	4,11 B
98 DDT	8,32 C	5,89 C

Valores con la misma letra no son distintos ($p<0,05$). DDT: días después del trasplante.

Continuando con la evolución del resto de los parámetros productivos, no se han encontrado diferencias significativas entre los dos híbridos (Tabla 5). La evolución de la producción comercial y del número de frutos comerciales recolectados a lo largo del ciclo son muy similares: se observa un incremento de ambos parámetros al inicio de la recolección, alcanzando el máximo en la 4ª

recolección (el 7 de julio), tras el que se produce un descenso, alcanzando el mínimo entre la 6ª y 9ª recolección (el 15 de julio y el 3 de agosto), tras el que aumenta ligeramente, estabilizándose hasta el final del cultivo. Por lo que se refiere al peso medio de los frutos comerciales, el de la 1ª recolección es claramente inferior al de las recolecciones 2ª a 6ª, durante las que se mantiene constante alrededor de 250 gramos/fruto. Durante las recolecciones 7ª a 10ª el peso medio se sitúa alrededor de los 150 gramos/fruto, mientras que en las dos últimas recolecciones se produce un descenso del peso medio, situándose entre 120 y 100 gramos/fruto. Este resultado es el esperado, y es el esperado en variedades tradicionales, como el tipo Muchamiel. Es posible que la intensidad del descenso obtenido sea demasiado importante. Las variedades comerciales, especialmente los híbridos F1, han sido seleccionadas para reducir este hecho.

Tabla 5. Test de rango múltiple LSD para el número de ramilletes y de ramilletes con frutos cuajados de los dos híbridos los tres muestreos.

	Producción comercial (g/m^2)	**Nº frutos recolectados por m^2**	**Peso medio del fruto (g)**
UMH1200x4	383,5 A	2,14 A	177,4 A
UMH1200x18	367,4 A	1,90 A	186,2 A
1ª , 25 junio	189 AB	1,11 A	158,1 C
2ª , 28 junio	231 B	0,99 A	245,1 D
3ª , 2 julio	456 C	2,00 B	225,4 D
4ª , 7 julio	1275 D	5,21 E	248,3 D
5ª , 12 julio	462 C	1,88 B	247,6 D
6ª , 15 julio	132 AB	0,64 A	219,5 D
7ª , 21 julio	182 AB	0,98 A	168,4 C
8ª , 27 julio	550 C	3,33 D	162,3 C
9ª , 3 agosto	92 A	0,68 A	134,3 BC
10ª , 11 agosto	459 C	3,08 CD	153,0 C
11ª , 18 agosto	245 B	2,03 C	118,4 AB
12ª , 25 agosto	238 B	2,31 BC	101,4 A

Valores con la misma letra no son distintos (p<0,05).

Por lo que se refiere al análisis global, no se han encontrado diferencias significativas entre los dos híbridos (Tabla 6). La producción comercial obtenida por los dos híbridos en este trabajo ha sido menor que la obtenida en las instalaciones del CIAGRO-UMH, como el de Cámara (2018) y el de Pérez (2020). Las diferencias se deben a las distintas densidades de plantación utilizadas, ya que en los ensayos del CIAGO-UMH es de 2,5 plantas/m^2, mientras que en este ensayo ha sido de 1,67 plantas/m^2. El peso medio de los frutos ha sido similar al de los trabajos comentados anteriormente.

Tabla 6. *P-value* y nivel de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial realizado para cada uno de los parámetros estudiados, considerando como factores la variedad y la fecha de recolección.

	Producción comercial (g/m^2)	Nº frutos recolectados por m^2	Peso medio del fruto (g/fruto)
ANOVA	0,2603 n.s.	0,1217 n.s.	0,3468 n.s.
UMH1200x4	7995 A	42,6 A	190,8 A
UMH1200x18	7318 A	37,4 A	197,5 A

Valores de significación: *(p < 0,05), **(p < 0,01), ***(p < 0,001), n.s. (> 0,05; sin diferencia significativa)

Ensayo 2

Al igual que en el ensayo 1, empezamos analizando la evolución de los parámetros estudiados a lo largo del cultivo, mediante el ANOVA multifactorial realizado (Tabla 7). Se han encontrado diferencias significativas entre las variedades para el número de ramilletes cuajados, el número de frutos comerciales recolectados y el peso medio de los frutos comerciales, mientras que para las fechas de recolección se han encontrado diferencias significativas para todos los caracteres estudiados. La interacción entre los factores ha sido significativa tres de los cinco parámetros, por lo que se utilizarán los gráficos de interacción, en lugar de los test de rango múltiple.

Tabla 7. *P-value* y nivel de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial del ensayo 2 realizado para cada uno de los parámetros estudiados, considerando como factores la variedad y la fecha de recolección.

	Nº de ramilletes	Nº ramilletes cuajados	Producción comercial	Nº frutos recolectados	Peso medio del fruto
Variedad (V)	0,0124 n.s.	0,0017 ***	0,7098 n.s.	0,0052 **	<0,0001 ***
Fecha de recolección (F)	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,0005 ***
Interacción VxF	0,1153 n.s.	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,0614 n.s.

Valores de significación: *(p < 0,05), **(p < 0,01), ***(p < 0,001), n.s. (> 0,05; sin diferencia significativa)

Por lo que se refiere a la evolución del número de ramilletes por planta, sólo se han encontrado diferencias significativas entre las variedades en el primer conteo, a los 69 días después del trasplante entre el híbrido 168TTx18 y la variedad tradicional Mercalicante (Figura 1). Los valores van aumentando conforme avanza el cultivo, como es normal, y también ocurría en el ensayo 1, con otros híbridos.

Para los ramilletes cuajados por planta sólo se han encontrado diferencias significativas entre las variedades en el segundo conteo, a los 93 días después del trasplante (Figura 2), siendo el híbrido 168TTx18 el que alcanza mayor valor, el híbrido 168TTx4 el que alcanza el valor intermedio, y Mercalicante la que alcanza el menor valor. La evolución de los ramilletes cuajados en Mercalicante es distinta a la de los híbridos, siendo más progresiva en la variedad tradicional.

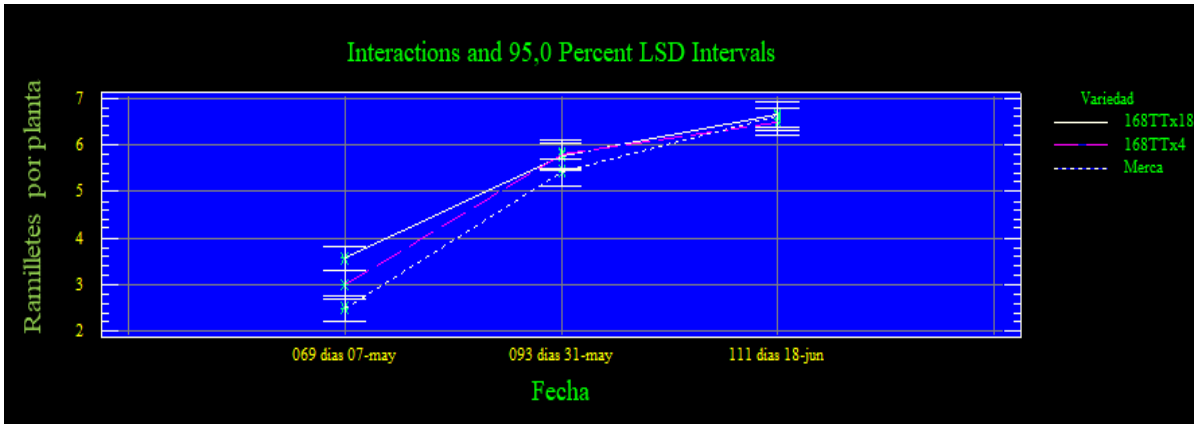


Figura 1. Gráfica de interacción Variedad x Fecha recolección para el número de ramilletes por planta.

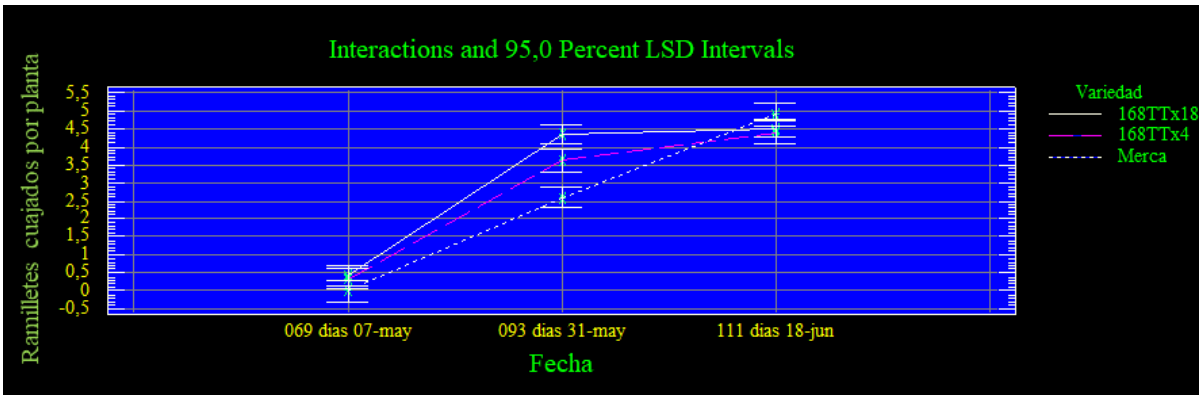


Figura 2. Gráfica de interacción Variedad x Fecha recolección para el número de ramilletes cuajados por planta.

Por lo que se refiere a la producción comercial, los dos híbridos han tenido una evolución distinta a la variedad Mercalicante (Figura 3). En los dos híbridos las 4 primeras recolecciones fueron importantes, y a partir de la 5ª se obtuvo un descenso, en Mercalicante las dos primeras recolecciones fueron prácticamente nulas, sufriendo un continuo incremento, alcanzando el máximo en la 5ª y 6ª recolección. En las tres variedades se observa un descenso en las 2 últimas recolecciones.

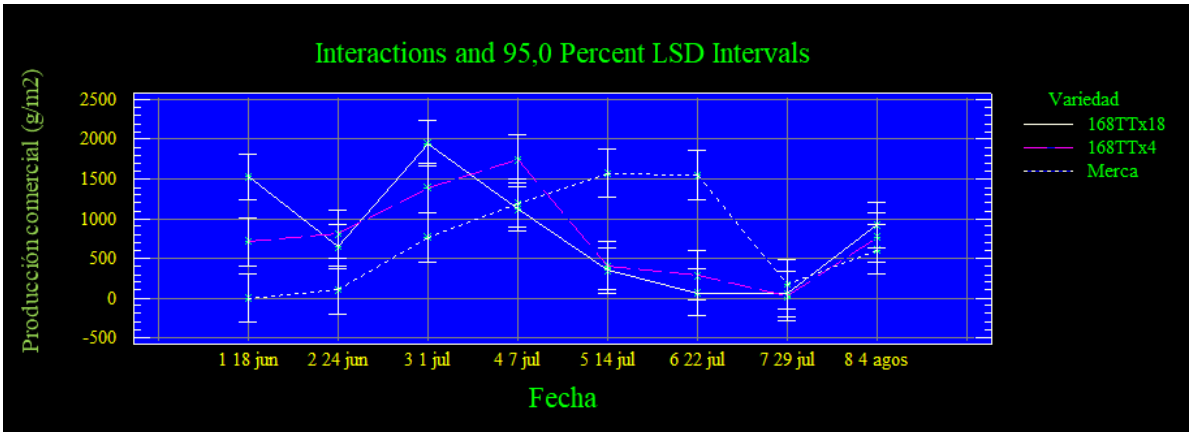


Figura 3. Gráfica de interacción Variedad x Fecha recolección para la producción comercial por m^2.

Los resultados obtenidos para el número de frutos comerciales recolectados (Figura 4) ha sido muy similar al de la producción comercial. La evolución de los híbridos ha sido distinta de la de la variedad Mercalicante, siendo de nuevo los híbridos más precoces. El incremento de los valores en la última recolección es debido a que se recolectaron todos los frutos de cada planta con tamaño comercial, aunque estuvieran inmaduros.

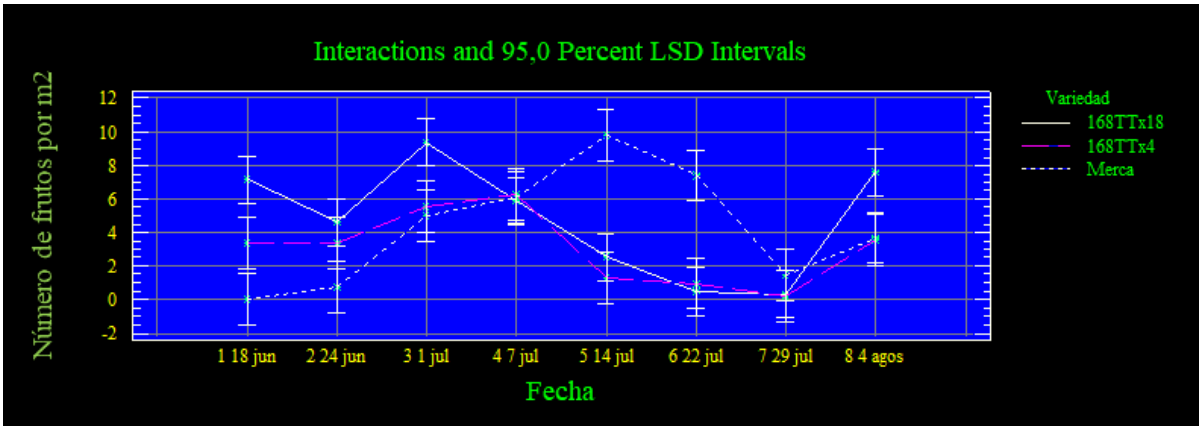


Figura 4. Gráfica de interacción Variedad x Fecha recolección para el número de frutos comerciales por m^2.

La evolución del peso medio de los frutos comerciales a lo largo del cultivo se muestra en la Figura 5. En las tres variedades el peso medio de los frutos comerciales aumenta ligeramente durante las primeras recolecciones, para descender en las últimas recolecciones. El descenso ha sido mayor en el híbrido 168TTx4, que es el que tiene mayor peso medio. La variedad Mercalicante es la que sufrió un menor descenso. Esta característica puede ser interesante a la hora de comercializar los frutos.

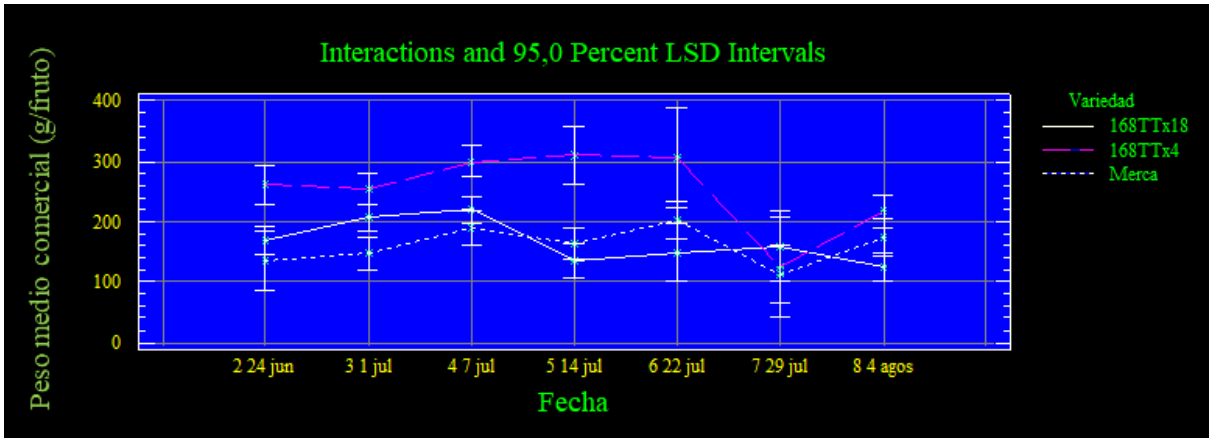


Figura 5. Gráfica de interacción Variedad x Fecha recolección para el peso medio de los frutos comerciales.

Por lo que se refiere al análisis global, no se han encontrado diferencias significativas entre los dos híbridos (Tabla 8). No se han encontrado diferencias significativas para la producción comercial de las tres variedades estudiadas, pero sí que se han encontrado diferencias significativas para el número de frutos comerciales y el peso medio de los mismos. La producción comercial obtenida por los dos híbridos del ensayo 2 ha sido similar a la de los híbridos del ensayo 1, y menor a la obtenido por híbridos Muchamiel similares en las instalaciones del CIAGRO-UMH, como el de Cámara (2018) y el de Pérez (2020). Como se ha comentado anteriormente, las diferencias se deben, entre otras cosas, a las distintas densidades de plantación utilizadas. El peso medio de los frutos comerciales de los

híbridos obtenido en el ensayo 2 ha sido claramente superior al del ensayo 1. Esto es debido a los híbridos del ensayo 2 tienen mayor tamaño que los del ensayo 1, al utilizar como parental resistente la línea de mejora 168TT. S espera que se confirmen estos resultados, pues es la primera vez que se incluyen los híbridos en un ensayo.

Tabla 8. *P-value* y nivel de significación obtenidos en el ANOVA unifactorial del ensayo 2 realizado para cada uno de los parámetros estudiados, en las distintas variedades y test de rango múltiple LSD.

	Producción comercial (g/m^2)	**Nº frutos recolectados por m^2**	**Peso medio del fruto (g/fruto)**
ANOVA	0,6829 n.s.	0,0002 ***	0,0015 **
168TTx4	7755 A	30,7 A	252,0 B
168TTx18	7130 A	39,7 B	188,0 A
Mercalicante	7579 A	42,7 B	183,2 A

Valores de significación: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$), n.s. (> 0,05; sin diferencia significativa). Valores con la misma letra no son distintos ($p<0,05$).

Conclusiones

Los híbridos Muchamiel con resistencia genética a ToMV, TYLCV y TSWV estudiados en los 2 ensayos han obtenido resultados interesantes en los parámetros estudiados, como la producción comercial y el peso medio de los frutos comerciales. Es posible mejorar la productividad aumentando la densidad de plantación utilizada. Está previsto analizar algunos caracteres de calidad, como el contenido de sólidos solubles y la acidez valorable, ya que se dispone de muestras congeladas para hacerlo. Estos resultados pueden ayudar a los agricultores que se planteen el cultivo de tomate Muchamiel.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Ayuntamiento de Mutxamel, mediante el contrato "Seguimiento y evaluación agronómica y de calidad de 3 ensayos de tomate Muchamiel en el término municipal de Mutxamel durante el ciclo de primavera-verano 2021", firmado con el CIAGRO-UMH. Los autores agradecen a Rosa Ana Rodríguez Pastor y a Juan Pedro Morales Pérez por los cultivos realizados.

Bibliografía

Cámara B., 2019. Evaluación de híbridos de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) Muchamiel con resistencia a virus. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández, Orihuela.

Nicasio, J.J. 2017. Las figuras de calidad agroalimentaria diferenciadas como herramientas para un desarrollo rural sostenible. En Soler, S., Figás, M.R., Prohens, J. (Editores). I Congrés de la Tomaca Valenciana: la Tomaca Valenciana d'El Perelló. UPV.

Nuez, F., Roselló, S. y Picó, B. (1998). La conservación y recuperación de nuestro patrimonio hortícola. Mejorar para conservar. Agrícola Vergel 194: 74-80.

Nuez, F. y Ruiz, J.J. (1999). La Biodiversidad Agrícola Valenciana: estrategias para su conservación y utilización. Editorial de la UPV.

Pérez, S., 2020. Estudio de líneas de tomate Muchamiel derivadas del programa de mejora genética de variedades tradicionales de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) de la EPSO-UMH injertadas en dos patrones comerciales. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández, Orihuela.

Efecto de nanotubos de carbono sobre diferentes combinaciones de citoquininas en la proliferación *in vitro* del portainjertos Garnem.

J. A. Medina [1], F. Hernández [2] y A. Galindo[3]

[1] Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH). Ctra. Beniel, km 3.2, 03312-Orihuela, Alicante Spain ;jose.medina11@goumh.umh.es

[2] Grupo de Investigación en Fruticultura y Técnicas de Producción, Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, km 3.2, 03312-Orihuela, Alicante, Spain; francisca.hernandez@umh.es

[3] Departamento de Agronomía, ETSIA, Universidad de Sevilla, Carretera de Utrera, km 1, 41013 Sevilla, Sevilla, Spain; agegea@us.es

Resumen

En el presente estudio se pretende analizar el efecto de nanotubos de carbono sobre diferentes combinaciones de citoquininas en la proliferación de planta *in vitro* del patrón de almendro Garnem (GxN-15). Las citoquininas seleccionadas para este estudio son: 6-BAP, 2IP y Meta-Topolina y sus concentraciones 0,5, 0,45 y 0,54 mg/L, respectivamente. Se realizan combinaciones pareadas, creando inicialmente 3 combinaciones (6-BAP + 2-IP; 6-BAP + Meta-Topolina; 2IP + Meta-Topolina). De estas combinaciones surgen dos variantes: una que incluye nanotubos de carbono (MWCNTs) a una concentración de 10 mg/L y otra que no, creando finalmente 6 tratamientos diferentes. Cada una de estas combinaciones es añadida a un medio de cultivo, compuesto por los macronutrientes del medio original QL y los micronutrientes y vitaminas del medio original DKW. Posteriormente, se cultivan los explantos en cada uno de estos medios de cultivo y se mantienen en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 25 ±2 ºC durante 3 semanas. Transcurrido el periodo de cultivo, se procede al análisis de los resultados, donde se tiene en cuenta el número de brotes por explanto y la longitud de los brotes. A continuación, se lleva a cabo un segundo ciclo de cultivo de 3 semanas en las mismas condiciones que el primero para, a su fin, medir de nuevo las mismas variables que antes. Los resultados de ambos ciclos se usan para evaluar la efectividad de cada uno de los tratamientos, definiendo cuál es el mejor de ellos a la hora de la proliferación de nuevos brotes de Garnem y si existe mayor absorción de citoquininas (traducida en mayor proliferación) en explantos cultivados en medios de cultivo con MWCNTs.

Palabras clave: Micropropagación, Garnem, Nanotubos, Citoquininas,

Effect of carbon nanotubes on different combinations of cytokinins in the in vitro proliferation of Garnem rootstocks

Abstract

The present study aims to analyze the effect of carbon nanotubes on different combinations of cytokinins in the in vitro plant proliferation of the Garnem almond stock (GxN-15). The cytokinins selected for this study are: 6-BAP, 2-IP and Meta-Topolin and their concentrations 0.5, 0.45 and 0.54 mg/L, respectively. Paired combinations are made, initially creating 3 combinations (6-BAP + 2-IP; 6-BAP + Meta-Topolin; 2-IP + Meta-Topolin). Two variants emerge from these combinations: one that includes carbon nanotubes (MWCNTs) at a concentration of 10mg/L and the other that does not, finally creating 6 different treatments. Each of these combinations is added to a culture medium, composed of the macronutrients from the original QL medium and the micronutrients and vitamins from the original DKW medium. Subsequently, the explants are cultured in each of these culture media and kept in a growth chamber with a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness at a temperature of 25 ± 2 ºC during 3 weeks. After the cultivation period, the results are analyzed, where the number of shoots per explant and the length of shoot are taken into account. Subsequently, a second cultivation cycle of 3 weeks is carried out under the same conditions as the first to, at the end, measure again the

same variables as before. The results of both cycles are used to evaluate the effectiveness of each of the treatments, defining which is the best of them on the proliferation of new Garnem shoots and if there is greater absorption of cytokinins (translated into greater proliferation) in explants grown in culture media with MWCNTs..

Key Words: Micropropagation, Garnem, Nanotubes, Cytokinins.

Introducción

"Garnem" (GxN-15) es un portainjertos de especies de *Prunus* muy utilizado debido a su adaptación a suelos calcáreos y resistencia a nematodos (Unek et al., 2011). Se trata de un patrón híbrido de Almendro "Garfi" x Melocotón "Nemared", el cual tiene su origen en la Unidad de Fruticultura, SIA-DGA, Zaragoza, España, y su obtención se atribuye a A. Felipe, J. Gomez-Aparisi, M. Carrera, y R. Socias (Finn and Clark, 2008).

Una manera altamente eficiente de propagar Garnem es mediante el cultivo *in vitro* de plantas, técnica conocida con micropropagación. Se trata de una técnica de propagación vegetativa que consiste en la introducción de material vegetal aséptico con capacidad proliferativa en recipientes aislados en condiciones muy controladas. Esa capacidad proliferativa es debida a dos procesos principales: la embriogénesis y la organogénesis (Dinkins et al. 2003). Aprovechando la capacidad de regeneración en la que los explantos pueden formar tejidos y órganos a través de callos, se puede crear un sistema de propagación muy rápido y eficiente (Ružić and Vujović, 2008). Dicho sistema es permitido por la diferenciación de los tejidos, la cual viene dada principalmente por la presencia de fitorreguladores (siendo las auxinas, giberelinas y citoquininas los más usados en cultivo *in vitro*) en el medio de cultivo y sus concentraciones (Pérez-Jiménez et al., 2014).

Dentro de las fases del cultivo in vitro, la fase de proliferación es la más determinante, debido a que es la que permite la obtención de nuevos brotes (Ritterbusch et al., 2020) y se da, principalmente, gracias a la presencia de citoquininas en el medio de cultivo. Estas citoquininas son añadidas de manera exógena, y en muchos casos se trata de citoquininas sintéticas. El efecto que provocan dichos fitorreguladores es la inducción de cambios en las células de la planta, entre los que destaca la estimulación de la producción de citoquininas endógenas, desempeñando un importante papel en la organogénesis (Perez-Jimenez et al., 2014). Específicamente, en Garnem, una de las citoquininas más usada es 6-Bencilaminopurina (6-BAP) la cual se usa en una adecuada combinación con una auxina que le aporte el equilibrio necesario de fitorreguladores a la planta. (Arab et al., 2014)

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones sobre los nanomateriales en agricultura, destacando en cutlivo *in vitro* el uso de nanotubos de carbono debido a sus importantes propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas y químicas (Taha et al., 2016). Gracias a estos trabajos, surgen nuevas técnicas con las que potenciar, entre otras cosas, la proliferación de nuevos brotes en un explanto. Destaca un trabajo realizado por Sarikhani et al. en 2017, el cual fue realizado sobre GF677, otro portainjertos de *Prunus* muy usado en la actualidad. Utilizaron nanotubos de carbono multipared (MWCNTs) en combinación con la citoquinina 6-BAP, y descubrieron que dichos nanotubos son capaces de potenciar la absorción de citoquininas por parte de la planta, contribuyendo por tanto a una mayor proliferación (Sarikhani et al., 2017).

Por tanto, los objetivos de este estudio son, por un lado, dilucidar cuál de todas es la mejor combinación de fitorreguladores para una mayor proliferación de brotes y, por otro lado, determinar si

la presencia de nanotubos afecta positivamente a la planta de manera que esta es capaz de potenciar la absorción de citoquininas presentes en el medio de cultivo.

Material y Métodos

Para el desarrollo de este estudio, se usaron 5 explantos de GxN-15 como material vegetal por cada tratamiento. Se trata de un material vegetal proveniente de la actividad productiva de la empresa Invisa Biotecnología Vegetal, en la cual ha sido desarrollado todo el trabajo.

En primer lugar, se llevó a cabo un diseño del medio de cultivo, el cual se compuso de los macronutrientes descritos en el medio QL (Quoirin and Lepoivre, 1977), mientras que los micronutrientes y vitaminas usados han sido los descritos en el medio DKW (Driver and Kuniyuki, 1984). Como aditivos, se han añadido sacarosa a una concentración de 30 g/L, e inositol a una concentración de 0,1 g/L, además del agente gelificante agar bacteriológico a 6 g/L. Por otro lado, a todos los medios de cultivo (excepto el control) se les adicionó la auxina IAA a una concentración de 0,1 mg/L.

En cuanto a los reguladores de crecimiento, se han utilizado las citoquininas 6-BAP (6-bencilaminopurina), 2IP (2-isopentenil-adenina) y mT (Meta Topolina), todas ellas sintéticas. Para determinar las concentraciones de estas citoquininas, se tomó como referencia la concentración de 0,5 mg/L en 6-BAP y, a partir de esta, se calcularon las concentraciones de 2IP y mT en base a su molaridad. De esta manera, las concentraciones de 6-BAP, 2IP y mT fueron de 0,5, 0,45 y 0,54 mg/L, respectivamente. Los nanotubos de carbono se añadieron al medio de cultivo a una concentración de 10 mg/L.

Una vez determinado el medio de cultivo y las concentraciones de sus componentes, se llevó a cabo la creación de los distintos tratamientos que conformarían el estudio. Dichos tratamientos se compusieron de una serie de diferentes combinaciones entre las citoquininas mencionadas anteriormente, de tal manera que se obtuvieron tres combinaciones principales: 6-BAP +2 IP, 6-BAP + mT y 2IP + mT. A cada una de estas combinaciones se le añadieron MWCNTs, conformando finalmente 6 combinaciones más un control para el desarrollo del estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de cada uno de los tratamientos. Se indica con una X que ese componente está presente en un determinado tratamiento.

Combinación	6-BAP	2IP	mT	MWCNTs
A	X	X		
B	X	X		X
C	X		X	
D	X		X	X
E		X	X	
F		X	X	X
Control				

A continuación, los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 6,0. Posteriormente, fueron dispensados en recipientes de cristal de 200 ml de capacidad, añadiendo 30 ml de medio de cultivo líquido a cada recipiente para después autoclavarlos a una temperatura de 121 ± 2 ºC.



Figura 1. Explantos manipulados antes de cultivarlos en los diferentes tratamientos.

El siguiente paso fue el cultivo de los explantos. Inicialmente, todos fueron cultivados en el medio de cultivo de la combinación G (control, sin presencia de ningún fitorregulador) para procurar que las muestras vegetales se estabilizasen. Es decir, para evitar que los resultados pudieran ser debidos a las citoquininas presentes en el medio del que provenían los explantos, se les aplicó un ciclo de cultivo de tres semanas de duración en un medio sin ningún fitorregulador. De esta manera, los explantos comenzarían los tratamientos libres de cualquier resto de citoquinina. Este primer cultivo se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar horizontal. Se mantuvieron durante tres semanas en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad a una temperatura de 24±2 ºC.

Transcurrido este tiempo, los explantos se repartieron para conformar las 5 muestras de cada tratamiento y sembrar cada una de ellas en su respectivo medio de cultivo. Todos los explantos fueron manipulados para que comenzaran el experimento en las mismas condiciones (Figura 1): 5 brotes, 2 cm de altura y reducción total del callo. De nuevo, se mantuvieron tres semanas en la cámara de crecimiento, esta vez en los medios de cultivo de cada tratamiento.

Una vez transcurridas estas últimas tres semanas, se llevó a cabo una primera toma de datos, en la que se determinó el número de brotes de cada explanto y se midió la longitud de los mismos con un calibre (Figura 2). Seguidamente, los mismos explantos que han sido analizados se vuelven a cultivar en medio fresco (cada uno en el mismo medio de cultivo del que provenía, continuando así los tratamientos) y se vuelven a almacenar durante otras tres semanas en cámara de cultivo. Transcurridas estas últimas tres semanas, se realiza una segunda toma de datos, midiendo los mismos parámetros que en la primera.



Figura 2. Medición de los parámetros de evaluación.

Finalmente, una vez que fueron recopilados todos los datos, se llevó a cabo el análisis estadístico de los mismos. Para ello, se realizó un ANOVA a las medias de cada parámetro en cada uno de los ciclos (dos ANOVA del número de brotes de cada explanto, correspondiendo ambos análisis a cada ciclo; dos ANOVA de la longitud de los brotes, correspondiendo ambos análisis a cada ciclo). Además, se clasificaron los datos en grupos estadísticamente diferentes según el test de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

Resultados

En cuanto a la media del número de brotes del primer ciclo (Tabla 2), se observa que el tratamiento que mayor valor presenta en este parámetro es el B (media de 24,80 brotes). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre este tratamiento y el A, C y D, puesto que los 4 pertenecen al grupo a. A su vez, los tratamientos A y D son estadísticamente iguales a los tratamientos E y F (grupo b). Estos dos últimos tratamientos son los que menor número de brotes por explanto presentan, y además son estadísticamente iguales al control (grupo c). En relación a esto último, podemos afirmar que los tratamientos A-D sí han sido efectivos, puesto que son diferentes estadísticamente del control. En cuanto a la longitud de brotes, los más altos pertenecen al tratamiento F, con un valor medio de 1,73 cm, aunque estadísticamente este tratamiento es igual D, E y control, el cual es igual a todos los tratamientos (presenta un valor medio). Asimismo, el F es el único tratamiento que tiene diferencias estadísticas con otros tratamientos, que son el A, B y C. El resto de tratamientos son todos, de una manera o de otra, estadísticamente iguales entre sí.

Los resultados del segundo ciclo muestran lo siguiente: el mayor valor de la media del número de brotes por explanto lo presenta el tratamiento D, con una media de 38 brotes (Tabla 2). Los tratamientos B y C presentan resultados muy similares, mientras que el tratamiento A tiene el valor más bajo de los primeros cuatro tratamientos. No obstante, de estos últimos, los tratamientos B, C y D son estadísticamente iguales. En cuanto al tratamiento A, es estadísticamente igual a B y C, pero diferente al D. Por otra parte, los tratamientos E y F presentan los valores más bajos de todos los

tratamientos, siendo estos 12,20 y 14,20, respectivamente y, además, estadísticamente diferentes del resto (salvo del tratamiento A, que es igual al F). De igual manera que en el primer ciclo, los tratamientos A, B, C y D son estadísticamente diferentes que el control, no cumpliendo esta premisa los tratamientos E y F, los cuales son iguales entre sí y al control y diferentes del resto de tratamientos. Los tratamientos A, B, C y D se encuentran en el mismo grupo estadístico (Tabla 2), que a su vez son iguales al control. En cuanto a la longitud de brotes, a diferencia del primer ciclo, se observa como los resultados se han estabilizado bastante. De esta manera, los tratamientos A, B, C y D son iguales entre sí y el control, mientras que son estadísticamente diferentes al E y F. A su vez, estos dos últimos son iguales estadísticamente entre sí e iguales al control, mientras que son diferentes a los tratamientos A, B, C y D.

Tabla 2. Número de brotes medio por cada tratamiento y media de longitud de los mismos, tanto en el primer como en el segundo ciclo de cultivo. El análisis estadístico de los resultados de cada tratamiento se realizó mediante un ANOVA. En una misma columna, los tratamientos que no tienen una letra común son significativamente diferentes entre sí, comprobado mediante el test de Tukey ($P < 0.05$).

Tratamiento	Primer ciclo		Segundo ciclo	
	Nº brotes	Longitud brotes (cm)	Nº brotes	Longitud brotes (cm)
A	17.80 ab	1.09 bc	24.20 bc	1.66 b
B	24.80 a	0.98 c	30.40 ab	1.71 b
C	23.80 a	1.19 bc	30.80 ab	1.61 b
D	21.40 ab	1.26 abc	38 a	1.63 b
E	11.40 bc	1.54 ab	12.20 d	2.66 a
F	11.60 bc	1.73 a	14.20 cd	2.68 a
Control	5.60 c	1.48 abc	5.40 d	2.17 ab

Discusión

Resultados generales en relación a la proliferación de nuevos brotes

En el primer ciclo, analizando desde el punto de vista general se puede observar que la mera presencia de citoquininas sí tiene un efecto sobre la proliferación de nuevos brotes en los explantos, ya que así nos lo muestran los datos del número de brotes del tratamiento control (5,60 brotes, teniendo en cuenta que el explanto sembrado en primera instancia tenía 5 brotes; medio de cultivo control sin ninguna citoquinina ni nanotubos de carbono) (Tabla 2). Se observa como los tratamientos A, B, C y D son estadísticamente diferentes al control, por lo que podemos afirmar que la combinación de fitorreguladores de estos medios es efectiva. Sin embargo, aunque se observa que los tratamientos E y F muestran mayor número de brotes que el control, la estadística nos muestra que no hay diferencias significativas con este control. Este hecho puede ser debido a la ausencia de la citoquinina 6-BAP en los tratamientos E y F, la cual si está presente en los tratamientos A-D (Tabla 1). Además, esta hipótesis se ve reforzada por estudios previos, como el que fue realizado por Arab M. e investigadores en 2017, en el que, entre otras cosas, ponían de manifiesto que la mayor proliferación de nuevos brotes de Garnem se daba en presencia de la citoquinina 6-BAP.

De igual manera, en el segundo ciclo se manifiestan resultados similares a los del primer ciclo. En este caso, las diferencias respecto al control son mayores, lo cual es lógico, puesto que, a diferencia de los resultados del primer ciclo (explantos creciendo en cámara de cultivo durante 3 semanas), los resultados del segundo ciclo se dan cuando los explantos llevan ya 6 semanas creciendo en sus recipientes en la cámara de cultivo. En este sentido, se puede observar como el control mantiene un número medio de brotes por explanto prácticamente idéntico al del primer ciclo (5,40 en el segundo ciclo por los 5,60 del primer ciclo), mientras que, por ejemplo, el tratamiento D se da un aumento

entre un ciclo y otro de 16,60 brotes de media (Tabla 2). Igualmente, en el resto de tratamientos se observa un incremento en el número de brotes respecto al mismo tratamiento en el primer ciclo, aunque menor que para el tratamiento D. Estadísticamente se aprecian resultados muy similares a los del primer ciclo, donde los tratamientos A, B, C y D sí muestran diferencias con el control, mientras que los tratamientos E y F no. La baja proliferación de estos dos últimos tratamientos ya se demostró en el primer ciclo, constatando además que no ha existido mejora con otras tres semanas de cultivo. Este hecho concuerda con otro estudio, en el que analizaron la eficacia de 2-IP en explantos de Garnem, y demostraron que no induce muy buena proliferación (Unek et al., 2011). De igual manera, para mT se ha demostrado que en otras especies, generalmente no induce buenos resultados en la proliferación de brotes *in vitro* (Kucharska et al., 2020), hecho que también parece demostrarse en este estudio, donde la presencia de mT en combinación con 2IP a las concentraciones usadas no es suficiente en explantos de Garnem para ofrecer una buena proliferación, si comparamos los tratamientos E y F frente al resto (Tabla 2). Por otra parte, en este ciclo hay que destacar un caso específico, el del tratamiento A, ya que la estadística muestra que no existen diferencias con el tratamiento F (Tabla 2). Este hecho puede ser debido a un error en la toma de datos o a que el número de explantos usados para determinar este parámetro no fue el suficiente.

En general, es obvio que la presencia de citoquininas produce una mayor proliferación de nuevos brotes. Observar las notables diferencias en la Figura 3.



Figura 3. A la izquierda, un explanto perteneciente al tratamiento D. A la derecha, un explanto control.

Resultados en relación a los tratamientos con MWCNTs

Para llevar a cabo la discusión de este apartado, las comparaciones han de realizarse con un tratamiento con nanotubos respecto al tratamiento que presenta su misma combinación de citoquininas en ausencia de nanotubos. Estas combinaciones son: A-B, C-D, E-F (Tabla 1).

En cuanto a los resultados obtenidos en el primer ciclo, se observa como aquí no existe una clara mejoría en los tratamientos con nanotubos respecto a los de su misma combinación de citoquininas sin nanotubos. Aunque en el tratamiento A el número medio de brotes por explanto es menor que en el tratamiento B, la estadística determina que no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos (Tabla 2), por lo que en este primer ciclo no podemos afirmar que la presencia de MWCNTs potencie la absorción de citoquininas por parte de la planta. De igual manera ocurre con el resto de tratamientos. Los resultados del número de brotes en los tratamientos C y D muestran que no existe una diferencia significativa (Tabla 2). De hecho, se observa un mayor número de brotes en el tratamiento C que en el D (siendo este último el que presenta nanotubos de carbono), aunque dicha diferencia es mínima, por lo que no podemos tomarla como referencia para evaluar si la presencia de

nanotubos tiene o no tiene efecto. Por otra parte, para los tratamientos E y F observamos que no existe ninguna diferencia entre ellos en cuanto al número de brotes.

En cuanto al número de brotes del segundo ciclo, tampoco existen diferencias significativas entre los tratamientos comparables (Tabla 2). Sin embargo, sí que se observan diferencias respecto a los resultados del primer ciclo. De este modo, entre el tratamiento B y A se da una diferencia de 6,20 brotes (Tabla 2). Igualmente, entre los tratamientos D y C también se observa mayor diferencia respecto a los datos del primer ciclo, y es que, en este segundo ciclo, el tratamiento D obtiene un aumento de 7,20 brotes respecto al C. Sin embargo, entre los tratamientos E y F no se observa diferencia alguna. A simple vista, se podría concluir que los MWCNTs potencian la absorción de citoquininas por parte de la planta en los tratamientos donde está presente 6-BAP, lo que concuerda con el estudio realizado por Sarikhani et al. en 2017, en el que demostraron la eficacia de los MWCNTs en explantos de GF677. Sin embargo, al no existir diferencias significativas entre las parejas de tratamientos con y sin MWCNTs, se desmiente que en Garnem, a la concentración usada de MWCNTs y de citoquininas, se potencie la absorción de estas hormonas constatado con un aumento en la proliferación de nuevos brotes. Para demostrar que sí tiene efecto (tal y como se atisba en los resultados mostrados en la Tabla 2), habría que realizar otro estudio en el que se modifiquen las concentraciones, descubriendo si existe otra combinación de concentraciones con la que sí sea significativa la diferencia entre tratamientos con MWCNTs respecto a tratamientos en los que no estén presentes.

Resultados en relación a la longitud de los brotes

En cuanto a los datos de la longitud de brotes, en el primer ciclo se observa una relación entre la cantidad de brotes que tiene un explanto y su longitud. Existe una tendencia a aumentar dicha longitud conforme el número de brotes es menor. Así, en la Tabla 2 se puede observar, por ejemplo, que en el tratamiento A, la media del número de brotes por explanto es de 17,80 y su longitud de 1,09 cm, mientras que para el tratamiento B el número medio de brotes por explanto es de 24,80 (mayor que en el A) y su longitud media de 0,98 (menor que en el A). De igual manera sucede para el resto de tratamientos.

En el segundo también se repite este hecho (Tabla 2): los tratamientos E y F, con una media de brotes por explanto de 12,20 y 14,40 respectivamente, presentan las mayores longitudes de brotes (2,66 cm para el E y 2,68 cm para el F), mientras que los tratamientos A, B, C y D presentan mayor número de brotes por explanto y menor longitud de esos brotes. De hecho, en este ciclo se observa como los tratamientos se diferencian bastante estadísticamente respecto a los del primer ciclo (Tabla 2). Se puede afirmar que un mayor periodo de tiempo propicia la estabilización de la longitud de los brotes. Además, puesto que los tratamientos A, B, C y D se encuentran en el mismo grupo estadístico y todos ellos son diferentes a los tratamientos E y F, se demuestra que la citoquinina 6-BAP es la responsable de la menor longitud de los brotes, mientras que 2IP y mT propician un aumento de dicha longitud. Recurriendo a un estudio mencionado anteriormente, se observa que el aumento de longitud de los tratamientos E y F puede ser debido a la presencia de mT, pues así fue demostrado en otras especies (Kucharska et al., 2020). Por lo tanto, las citoquininas 2IP y mT parecen contribuir más a la elongación que a la porliferación de nuevos brotes.

Conclusiones

Las citoquininas son más que necesarias para una adecuada proliferación de nuevos brotes en un explanto de Garnem a lo largo del tiempo. Así lo demuestran los datos arrojados en este estudio, siendo la media de brotes por explanto del segundo ciclo del tratamiento control de 5,40, mientras que

en el resto de tratamientos lo mínimo que podemos encontrar de media de brotes por explanto es de 12,20 (tratamiento E).

La citoquinina 6-BAP es la que mejor resultados ofrece para la planta en cuanto a la proliferación de nuevos brotes.

La combinación entre dos citoquininas no optimiza la proliferación de nuevos brotes, sino que esta es debida principalmente a una de las dos citoquininas presentes en el medio de cultivo.

Los nanotubos de carbono (MWCNTs) no facilitan la absorción de citoquininas en explantos de Garnem a una concentración de 10 mg/L ni a las concentraciones de citoquininas usadas en este estudio. Sin embargo, sí se muestran unas pequeñas diferencias, aunque no significativas, por lo que sería necesario otro estudio para dilucidar este punto.

El tratamiento D (6-BAP + mT + MWCNTs) es con el que se obtuvo mayor proliferación de nuevos brotes (38 brotes por explanto de media en el segundo ciclo).

Cuanto menor es el número de brotes por explanto, mayor es la longitud de los mismos.

Agradecimientos

A Invisa Biotecnología Vegetal, por facilitarme sus instalaciones y sus recursos para la realización de este estudio.

Bibliografía

Arab, M. M., Yadollahi, A., Ahmadi, H., Eftekhari, M., and Maleki, M. (2017). Mathematical Modeling and Optimizing of in Vitro Hormonal Combination for G × N15 Vegetative Rootstock Proliferation Using Artificial Neural Network-Genetic Algorithm (ANN-GA). Front Plant Sci 8, 1853.

Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S., and Ghojah, S. M. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on in vitro multiplication of G×N15 (hybrid of almond×peach) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **12**, 81-87.

Dinkins R.D., Reddy M.S.S., Meurer C.A., Redmond C.T., Collins G.B. (2003) Recent Advances in Soybean Transformation. In: Jaiwal P.K., Singh R.P. (eds) Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology. Focus on Biotechnology, vol 10B. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0139-6_1

Driver, J., and Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* **19**, 507-509.

Finn, C. E., and Clark, J. R. (2008). Register of New Fruit and Nut Cultivars List 44 %J HortScience horts. **43**, 1321.

Kucharska, D., Orlikowska, T., Maciorowski, R., Kunka, M., Wójcik, D., and Pluta, S. (2020). Application of meta-Topolin for improving micropropagation of gooseberry (Ribes grossularia). *Scientia Horticulturae* **272**, 109529.

Pérez-Jiménez, M., Cantero-Navarro, E., Pérez-Alfocea, F., and Cos-Terrer, J. (2014). Endogenous hormones response to cytokinins with regard to organogenesis in explants of peach (Prunus persica L. Batsch) cultivars and rootstocks (P. persica × Prunus dulcis). *Plant Physiol Biochem* **84**, 197-202.

Ritterbusch, C. W., Lucho, S. R., Radmann, E. B., and Bianchi, V. J. (2020). Effect of Cytokinins, Carbohydrate Source and Auxins on In Vitro Propagation of the 'G × N-9' Peach Rootstock. *International Journal of Fruit Science* **20**, S1607-S1619.

Sarikhani, H., Ghorbanizad, H., and Gholami, M. (2017). Effect of carbon nanotubes in micropropagation of GF677 (Prunus amygdalus × Prunus persica) rootstock. *Acta Horticulturae*, 245-250.

Taha, R. A., Hassan, M. M., Ibrahim, E. A., Abou Baker, N. H., and Shaaban, E. A. (2016). Carbon nanotubes impact on date palm in vitro cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **127**, 525-534.

Unek, C., Tanriver, E., and Küden, A. B. (2011). The effects of different cytokinins on micropropagation of 'garnem' rootstock. *In* "Acta Horticulturae", Vol. 923, pp. 195-198.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Diferencias en fenoles, flavonoides, flavonoles y actividad antioxidante totales entre 24 cultivares de tápenas de dos subespecies, *spinosa* y *rupestris*

M. Grimalt, M.S. Almansa, S. García, F. Hernández, P. Legua y A. Amorós

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO), EPSO (UMH) Carretera de Beniel Km 3.2 Orihuela (Alicante). E-mail: aamoros@umh.es

Resumen

La diversidad y variabilidad genética entre poblaciones es esencial para la supervivencia a largo plazo de las especies, así como para su adaptación a diferentes hábitats. La especie *Capparis spinosa* L. presenta dos subespecies en España: *C. spinosa ssp. spinosa*, con estípulas en forma de pinchas, y *C. spinosa ssp. rupestris* sin ellas. En España la subespecie usada para cultivo suele ser *C. spinosa ssp. spinosa*, que es complicada de manipular debido a sus espinas. Las partes de más valor de *Capparis spinosa*, usadas como alimento, son sus partes aéreas, especialmente las yemas florales (tápenas), los frutos no maduros (caparrones) y los tallos tiernos. Estas plantas han sido usadas tradicionalmente en muchos países para prevenir un alto número de enfermedades como son la diabetes, hepatitis, obesidad y problemas del riñón. Esto es debido a que la tapenera es una fuente rica de compuestos fenólicos, debido a que muchos flavonoides han sido hallados en diferentes partes de ella y en altas cantidades, lo que indica que es una buena fuente de compuestos funcionales, no sólo como alimento, sino también para aplicaciones nutracéuticas. No hay trabajos publicados sobre las diferencias en compuestos bioquímicos y funcionales de ambas subespecies, por lo que en este trabajo se han analizado los compuestos funcionales (fenoles, flavonoides, flavonoles y actividad antioxidante totales) de tápenas de 24 cultivares pertenecientes a ambas subespecies, localizadas en tres provincias, Alicante, Murcia y Almería, para conocer si hay diferencias entre ambas subespecies, poblaciones y cultivares. Los resultados obtenidos indicaron que no existen diferencias significativas entre las dos subespecies *spinosa* y *rupestris* para los parámetros estudiados. Se han encontrado más diferencias entre los resultados de la subespecie *spinosa*, que entre ella y la subespecie *rupestris*. Por todo ello, se puede concluir que la subespecie *rupestris*, que no presenta espinas, puede ser cultivada en lugar de la subespecie *spinosa*, que sí las presenta, sin pérdida de características funcionales de las tápenas.

Palabras clave: tápenas, fenoles, flavonoides, flavonoles, actividad antioxidante.

Differences in phenols, flavonoids, flavanols and total antioxidant activity between 24 caper cultivars of two subspecies, *spinosa* and *rupestris*

Abstract

Genetic diversity and variability between populations is essential for the long-term survival of species, as well as for their adaptation to different habitats. The *Capparis spinosa* L. species has two subspecies in Spain: *C. spinosa ssp. spinosa*, with spike-shaped stipules, and *C. spinosa ssp. rupestris* without them. In Spain the subspecies used for cultivation is usually *C. spinosa ssp. spinosa*, which is difficult to handle due to its spines. The most valuable parts of *Capparis spinosa*, used as food, are the aerial parts, especially the flower buds (caper), the immature fruits (caper berries) and the tender shoots. These plants have been used traditionally in many countries to prevent a high number of diseases such as diabetes, hepatitis, obesity and kidney illness. This is because the caper plant is a rich source of phenolic compounds, because many flavonoids have been found in different parts of it and in high quantities, which indicates that it is a good source of functional compounds, not only as food, but also for nutraceutical applications. There are no published works on the differences in biochemical and functional compounds of both subspecies, so in this work the functional compounds (phenols, flavonoids, flavonols and total antioxidant activity) of 24 cultivars belonging to both subspecies, located in three provinces (Alicante, Murcia and Almería) have been analysed to know if there are differences between both

subspecies, populations and cultivars. The results obtained indicated that there are no significant differences between the two subspecies *spinosa* and *rupestris* for the parameters studied. More differences have been found between the results of the *spinosa* subspecies, than between it and the *rupestris* subspecies. Therefore, it can be concluded that the *rupestris* subspecies, which does not present spines, can be cultivated instead of the *spinosa* subspecies, which does present them, without loss of functional characteristics of the caper buds.

Keywords: caper buds, phenols, flavonoids, flavanols, antioxidant activity.

Introducción y/o Justificación

La diversidad genética y variabilidad entre poblaciones es esencial para la supervivencia de las especies vegetales (Wang et al., 2016), así como para su adaptación a diferentes hábitats. La familia *Capparaceae* consta de 39 géneros y 650 especies, que se distribuyen en áreas cálidas alrededor del mundo. Se conocen cerca de 250 especies del género *Capparis*. Son nativas de los trópicos y posteriormente se diseminaron por la cuenca mediterránea y Asia Central (Zohary, 1960). En España se han cultivado desde antiguo, aunque en los últimos años ha decaído su producción. La tapenera es un arbusto xerofítico con una gran adaptabilidad a ambientes severos. Los países mediterráneos se encuentran en una región del mundo duramente amenazada por el cambio climático y esta especie es un cultivo prometedor para zonas áridas o semiáridas puesto que es altamente tolerante a la sequía y el estrés térmico (Grimalt et al., 2018). Por otra parte, la tapenera es una planta rica en compuestos fenólicos, debido a la alta concentración de flavonoides que presenta, lo que indica que es una buena fuente de compuestos funcionales tanto como alimento, como para aplicaciones nutracéuticas (Grimalt et al., 2018).

En España (Mateo y Crespo, 1995) y en Italia (Gristina et al., 2014), *C. spinosa* presenta dos subespecies en poblaciones silvestres y formas cultivadas, *C spinosa* L. *subsp. spinosa* y *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* (Sibth. & Sm.). La subsp. *spinosa* se caracteriza por tener ramas erectas o esparcidas, multiramificadas; estípulas conspicuas y pinchosas, la mayoría curvadas, decurrentes en la base. Mientras, la subsp. *rupestris* se caracteriza por tener ramas pendulosas, no ramificadas o poco ramificas; estípulas caducas (Fici, 2014). También han aparecido fenotipos intermedios que incrementan su diversidad genética. Desde el punto de vista agrícola, el cultivo y la recolección de las partes comestibles de la planta son muy problemáticos por las estípulas pinchosas, ya que se cultiva la subsp *spinosa*. Por esta razón sería muy útil saber si se puede cultivar la subsp. *rupestris* en su lugar, ya que no posee estípulas pinchosas, lo que facilitaría gran parte del trabajo de los agricultores. Para ello, habría que saber si esta subsp. presenta tan altas concentraciones de compuestos fenólicos y actividad antioxidante como la subsp. *spinosa*. Por ello, el objetivo o justificación de este trabajo ha sido estudiar las propiedades funcionales de las tápenas de 24 cultivares españoles de *Capparis spinosa* pertenecientes a ambas subespecies, con el fin de poder sustituir el cultivo de la subsp. *spinosa* por el de la subsp. *rupestris*.

Material y Métodos

Durante la fase reproductiva de las tapeneras (junio y julio) se recolectaron 200 tápenas de cada uno de los 24 cultivares de tapenera seleccionados de las provincias de Alicante (Orihuela), Murcia (Alberca y Alcayna) y Almería (Serón), que incluían a las dos subespecies, *spinosa* y *rupestris*. Posteriormente, se llevaron al laboratorio de Fisiología Vegetal de la EPSO, donde fueron liofilizadas y congeladas a -80 ºC.

Para la cuantificación de fenoles, flavonoides y flavonoles totales se hizo una extracción previa de las muestras pulverizadas con metanol al 80 % en una relación de 1:50 en peso:volumen (Argentieri et al., 2012). Los fenoles totales se cuantificaron usando el método de Singleton et al. (1999) con el reactivo

Folin-Ciocalteu y midiendo la absorbancia a 760 nm usando un espectrofotómetro Helios Gamma, con ácido gálico como patrón externo. Los resultados se expresaron como mg ácido gálico equivalentes (AGE) 100 g^{-1} peso seco (ps). Los flavonoides totales se cuantificaron usando el método de Chang et al. (2002) con modificaciones (Grimalt et al., 2019). La reacción era mantenida a temperatura ambiente durante 30 minutos y la absorbancia era medida a 415 nm. Los flavonoles totales fueron cuantificados usando el método de Kumaran et al. (2007) con ligeras modificaciones (Grimal et al., 2019), midiendo la absorbancia a 440 nm. Los resultados de flavonoides y flavonoles han sido expresados en mg rutina equivalentes (RE) 100 g^{-1} peso seco.

La actividad antioxidante se ha calculado en la fracción hidrosoluble (AAT-H) y en la fracción liposoluble (AAT-H) de las muestras, que fueron determinadas en la fase acuosa y orgánica de las muestras, respectivamente. La mezcla de reacción contiene ABTS, peróxido de hidrógeno y peroxidasa en tampón glicina-ClH pH 4.5 para AAT-H y etil acetato para AAT-L. La reacción era monitorizada a 730 nm hasta absorbancia estable. Después de esto, se añadió una cantidad de extracto y se observaba la disminución de la absorbancia hasta estabilizarse la lectura. Los resultados han sido expresados en mg Trolox equivalente (TE) 100 g^{-1} de peso seco (Arnao et al., 2001).

Posteriormente, se ha hecho un análisis estadístico seguido por una ANOVA para comparación de las medias. Se han llevado a cabo tres análisis: agrupando los cultivares por subespecie, agrupándolos por poblaciones y sin agrupar. El método usado para discriminar entre las medias (test de rango múltiple) era el LSD de Fisher al 95% de nivel de confianza. El análisis se ha realizado usando el paquete de software SPSS 18.0 para Windows (SPSS Science, Chicago, USA).

Resultados y Discusión

La tabla 1 muestra los resultados del contenido de fenoles, flavonoides y flavonoles totales. El contenido de fenoles y flavonoles totales se vio afectado por la subespecie y la población, mientras que los flavonoides totales fueron afectados sólo por la población. Respecto a los cultivares, el contenido más alto de fenoles totales fue observado en el cultivar 'TS1' con un total de 2899,88 mg AGE 100 g^{-1} ps, seguido por el cultivar 'TA2', siendo por el contrario el cultivar 'TE3' el que presentó el valor más bajo. Por otra parte, hubo diferencias significativas entre poblaciones y también entre subespecies. Las tápenas de las poblaciones 'TS' y 'TA' mostraron los mayores contenidos en fenoles totales (>2440 mg GAE 100 g^{-1} ps) en oposición a las poblaciones 'TE', 'TALB' y 'TALCY'; mientras que entre subespecies, fueron las tápenas de la subespecie *spinosa* las que presentaron los contenidos de fenoles totales más altos en comparación con la subespecie *rupestris*. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de fenoles totales fue influenciado por el genotipo y las condiciones ambientales.

En referencia al contenido de flavonoides totales, éste no se vio afectado por la subespecie; sin embargo, sí que se han encontrado diferencias significativas entre poblaciones y entre cultivares. Así, los valores máximos fueron obtenidos en las tápenas de las poblaciones 'TA', 'TS' y 'TE' (>2160 mg RE 100 g^{-1} ps). Respecto a entre cultivares el contenido de flavonoides totales estuvo en el rango de 1849,55 a 2495,46 mg RE 100 g^{-1} ps ('TALB1' y 'TA4', respectivamente). Finalmente, el contenido de flavonoles totales, también se vio significativamente afectado por la subespecie, la población y el cultivar. Así, el valor más alto observado fue en las tápenas de la subespecie *spinosa* y, entre poblaciones, en las 'TS' y 'TA' (>1854,39 mg RE 100 g^{-1} ps); mientras que entre cultivares, el valor más alto fue el encontrado en el cultivar 'TA4' (2227,77 mg RE 100 g^{-1} ps), mientras que el cultivar 'TE8' presentó el contenido menor (1299,80 mg RE 100 g^{-1} ps), comparados con los otros cultivares.

Aliyazicioglu et al. (2013) obtuvieron un valor de fenoles totales de 37,01 mg AGE 100 g^{-1} ps, que es mucho menor que los valores obtenidos en este estudio. Otro estudio llevado a cabo en diferentes regiones de Túnez (Tlili et al., 2010), obtuvo valores menores que los de este estudio, con un total de 2,74 mg 100 g^{-1} pf. Sin embargo, Mansour et al. (2016) encontraron valores más altos que los del

presente estudio, con un total de 427,27 mg AGE g^{-1} ps en fenoles totales y de 57,93 mg quercetina equivalentes g^{-1} ps en flavonoides. Inocencio et al. (2000) observaron una amplia variación en los contenidos de flavonoides de tápenas de diferentes regiones y propusieron que el ambiente y los factores fisiológicos podrían tener efectos importantes. Comparados con los fenoles totales de otras especies tales como mango (208 mg 100 g^{-1}), arándano (525 mg 100 g^{-1}) o frambuesa (517 mg 100 g^{-1}), los resultados obtenidos en las tápenas han mostrado que son una excelente fuente natural de estos compuestos (Tlili et al., 2010).

Tabla 1. Contenido en fenoles totales (mg AGE 100 g^{-1} ps), flavonoides y flavonoles totales (mg RE 100 g^{-1} ps) de las tápenas de las subspecies, poblaciones y cultivares analizados.

	Fenoles totales	**Flavonoides totales**	**Flavonoles totales**
Subsp.			
rupestris	1571,45 a	2166,70 a	1426,43 a
spinosa	2183,54 b	2187,79 a	1810,32 b
Población			
TE	1571,45 a	2166,70 ab	1426,43 a
TS	2445,69 b	2197,61 ab	1854,39 b
TA	2440,54 b	2305,08 b	1993,95 b
TALB	1547,84 a	2046,02 a	1551,37 a
TALCY	1494,86 a	1977,69 a	1448,62 a
Cultivar			
'TE 1'	1694,14 ± 32,87^{bc}	2334,27 ± 55,01^{defgh}	1353,31 ± 49,93^{ab}
'TE 2'	1676,79 ± 43,12^{bc}	2404,08 ± 79,22^{fgh}	1642,30 ± 116,25^{bcdefgh}
'TE 3'	896,25 ± 49,26^{a}	2157,95 ± 156,90^{abcdefgh}	1428,35 ± 230,24^{abcd}
'TE 4'	1396,44 ± 97,72^{ab}	2140,19 ± 65,93^{abcdefgh}	1410,55 ± 26,73^{abc}
'TE 5'	2030,31 ± 2,17^{cde}	1954,20 ± 84,26^{abc}	1378,24 ± 50,27^{abc}
'TE 6'	1679,32 ± 28,96^{bc}	2054,93 ± 75,14^{abcde}	1363,02 ± 66,71^{ab}
'TE 7'	1724,51 ± 22,59^{bc}	2043,17 ± 91,89^{abcde}	1449,51 ± 85,33^{abc}
'TE 8'	1491,06 ± 129,54^{b}	2032,83 ± 166,00^{abcd}	1299,80 ± 72,48^{a}
'TE 9'	1633,26 ± 59,60^{bc}	2215,48 ± 81,54^{bcdefgh}	1421,08 ± 54,86^{abcd}
'TE 10'	1492,40 ± 162,13^{b}	2329,86 ± 195,99^{defgh}	1518,16 ± 122,96^{abcde}
'TS 1'	2899,88 ± 66,53^{g}	2274,37 ± 82,88^{bcdefgh}	2107,02 ± 82,02^{jk}
'TS 2'	1784,84 ± 289,65^{bcd}	2063,61 ± 60,18^{abcdef}	1669,10 ± 30,01^{cdefg}
'TS 3'	2416,73 ± 249,64^{ef}	2293,41 ± 125,07^{cdefgh}	1897,33 ± 121,84^{fghij}
'TS 4'	2432,23 ± 361,11^{ef}	2099,84 ± 21,05^{abcdefg}	1758,88 ± 146,34^{defghi}
'TS 5'	2694,75 ± 168,28^{fg}	2256,83 ± 93,01^{bcdefgh}	1839,64 ± 164,37^{fghij}
'TA 1'	2771,26 ± 150,92^{fg}	2248,99 ± 155,73^{bcdefgh}	1869,77 ± 170,12^{fghij}
'TA 2'	2772,67 ± 240,67^{fg}	2276,86 ± 8,25^{bcdefgh}	1930,43± 39,08^{ghijk}
'TA 3'	2787,94 ± 244,86^{fg}	2349,45 ± 141,45^{efgh}	1951,59 ± 80,72^{hijk}
'TA 4'	2308,72 ± 43,12^{def}	2495,46 ± 153,91^{h}	2227,77 ± 225,85^{k}
'TA 5'	1562,10 ± 46,65^{bc}	2154,63 ± 58,86^{abcdefgh}	1990,21 ± 68,06^{ijk}
'TALB 1'	1506,16 ± 181,30^{b}	1849,55 ± 43,59^{a}	1425,30 ± 50,85^{abc}
'TALB 2'	1473,36 ± 73,12^{b}	1995,32 ± 190,12^{abcd}	1453,98 ± 109,27^{abcde}
'TALB 4'	1664,00 ± 69,45^{bc}	2293,18 ± 158,43^{bcdefgh}	1774,82 ± 211,57^{efghi}
'TALCY 2'	1494,86 ± 103,08^{bc}	1977,59 ± 71,00^{ab}	1448,62 ± 57,21^{abc}

Valores (media ± error estándar) seguidos por la misma letra, en la misma columna, no presentan diferencias significativas de acuerdo al LSD de Fisher al 95 % de nivel de confianza (n=30). TE: cultivar EPS Orihuela; TS: cultivar Serón; TA: cultivar Águilas; TALB: cultivar La Alberca; TALCY: cultivar La Alcayna.

Los resultados de la AAT (tanto AAT-H como AAT-L) (Tabla 2) mostraron que el genotipo tiene un papel importante determinando la capacidad antioxidante de cada cultivar. AAT-H no mostró diferencias entre subespecies, aunque sí entre poblaciones, siendo la población 'TS' la que presentó los valores mayores, con una media de 1403,36 mg TE 100 g^{-1} ps. Las poblaciones 'TA', 'TALB' y 'TALCY' presentaron los valores menores y sin diferencias significativas entre ellas. Respecto a los cultivares, el contenido de AAT-H mostró valores en un rango entre 384,99-1883,13 mg TE 100 g^{-1} ps en los cultivares 'TALB4' y 'TS1', respectivamente. En el caso del contenido de AAT-L, hubo diferencias entre subespecies y poblaciones, siendo la subespecie *rupestris* y la población 'TE' las que presentaron los mayores valores de AAT-L. Respecto a los cultivares, 'TE6' presentó el valor mayor con 460,00 mg TE 100 g^{-1} ps y 'TALB2' el valor más bajo con un total de 158,49 mg TE 100 g^{-1} ps.

Tabla 2. Actividad antioxidante total en la fracción hidro (AAT-H) y liposoluble (AAT-L) (mg Trolox eq 100 g^{-1} ps) de las tápenas de las subspecies, poblaciones y cultivares analizados.

	AAT-H	**AAT-L**
Subsp.		
rupestris	1036,93 a	305,85 b
spinosa	967,56 a	214,54 a
Población		
TE	1036,93 ab	305,81 b
TS	1403,36 b	215,88 a
TA	821,18 a	246,74 ab
TALB	654,44 a	168,67 a
TALCY	459,84 a	184,46 a
Cultivar		
'TE 1'	$1126,15 \pm 72,48^{fgh}$	$279,11 \pm 33,75^{fg}$
'TE 2'	$1223,37 \pm 32,55^{fghij}$	$276,41 \pm 83,45^{hi}$
'TE 3'	$1133,69 \pm 98,56^{efghi}$	$279,34 \pm 100,66^{hi}$
'TE 4'	$1046,38 \pm 107,14^{efgh}$	$359,80 \pm 26,30^{hi}$
'TE 5'	$562,26 \pm 235,40^{ab}$	$264,66 \pm 49,14^{def}$
'TE 6'	$619,55 \pm 4,53^{abcd}$	$460,00 \pm 14,15^{j}$
'TE 7'	$1033,70 \pm 139,08^{efg}$	$324,63 \pm 13,74^{gh}$
'TE 8'	$929,89 \pm 98,90^{def}$	$361,32 \pm 5,71^{hi}$
'TE 9'	$1548,77 \pm 57,88^{jkl}$	$267,81 \pm 21,53^{f}$
'TE 10'	$1145,59 \pm 34,37^{fghi}$	$185,01 \pm 48,29^{a}$
'TS 1'	$1883,13 \pm 243,83^{l}$	$277,90 \pm 21,87^{fg}$
'TS 2'	$1696,57 \pm 422,64^{ghijk}$	$189,55 \pm 37,05^{ab}$
'TS 3'	$1445,03 \pm 160,89^{hijk}$	$171,49 \pm 10,12^{abc}$
'TS 4'	$1237,76 \pm 136,07^{fghij}$	$235,17 \pm 11,6^{def}$
'TS 5'	$754,29 \pm 101,82^{bcde}$	$205,31 \pm 5,85^{bcde}$
'TA 1'	$787,52 \pm 164,32^{cdef}$	$241,19 \pm 16,70^{ef}$
'TA 2'	$470,78 \pm 176,44^{a}$	$235,85 \pm 12,97^{cdef}$
'TA 3'	$889,61 \pm 148,29^{def}$	$265,23 \pm 5,59^{f}$
'TA 4'	$1312,24 \pm 347,10^{ijkl}$	$248,72 \pm 33,89^{def}$
'TA 5'	$645,74 \pm 101,01^{abcd}$	$242,69 \pm 23,94^{ef}$
'TALB 1'	$448,45 \pm 21,93^{ab}$	$186,48 \pm 9,80^{abcd}$
'TALB 2'	$1129,87 \pm 114,29^{efghi}$	$158,49 \pm 27,95^{a}$
'TALB 4'	$384,99 \pm 32,96^{ab}$	$161,05 \pm 18,18^{abcd}$
'TALCY 2'	$459,84 \pm 29,11^{abc}$	$184,46 \pm 6,49^{abcde}$

Valores (media ± error estándar) seguidos por la misma letra, en la misma columna, no presentan diferencias significativas de acuerdo al LSD de Fisher al 95 % de nivel de confianza (n=30). TE: cultivar EPS Orihuela; TS: cultivar Serón; TA: cultivar Águilas; TALB: cultivar La Alberca; TALCY: cultivar La Alcayna.

Aunque las diferencias no fueron significativas para la media del parámetro AAT-H de las subespecies *rupestris* y *spinosa* y sí para el parámetro AAT-L, en ambos casos hubo más diferencias en los contenidos de ambos parámetros entre las poblaciones de *spinosa* que entre las medias de *spinosa* y *rupestris*. Grimalt et al. (2019) obtuvieron resultados ligeramente más altos en el contenido de AAT-H en tápenas y un poco menores en AAT-L que las presentadas en este trabajo. Tesoriere et al. (2007) encontraron valores más bajos de AAT-H y AAT-L en tápenas de cultivares italianos. Aliyazicioglu et al. (2003) obtuvieron valores de ABTS más bajos en cultivares tunecinos. Estas diferencias pueden ser debidas a diferencias tanto genotípicas como ambientales.

Conclusiones

De los resultados obtenidos para los parámetros funcionales estudiados, se deduce que no hay diferencias significativas entre las subespecies *spinosa* y *rupestris*. En todos los parámetros estudiados hay más diferencias entre los resultados obtenidos para los cultivares de la subespecie *spinosa* entre ellos, que con la subespecie *rupestris*. Por todo esto, se puede concluir que la subespecie *rupestris* que no presenta estípulas pinchosas, puede ser cultivada en lugar de la subespecie *spinosa* que sí las tiene, sin pérdida de características funcionales de las tápenas.

Agradecimientos

Los autores quieren dar las gracias a la Consellería de Educación, Investigación, Cultura y Deportes de la Generalitat Valenciana por aportar los fondos para llevar a cabo esta investigación (AICO-2016/015).

Bibliografía

Aliyazicioglu, R., Eyupoglu, O.E., Sahin, H., Yildiz, O., Baltas, N., 2013. Phenolic components, antioxidant activity, and mineral analysis of *Capparis spinosa* L. Afr J Biotechnol 12, 6643-6649. DOI: http://doi.org/10.5897/AJB2013.13241

Argentieri, M., Macchia, F., Papadia, P., Fanizzi, F.P., Avato, P., 2012. Bioactive compounds from *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*. Ind Crops Prod 36, 65-69. http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.08.007

Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., 2001 The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chem 73, 239–244. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1

Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal 10, 178-182. http://doi.org/10.12691/jnh-5-2-4

Fici, S., 2014. A taxonomic revision of the *Capparis spinosa* group (Capparaceae) from the Mediterranean to Central Asia. Phytotaxa 174(1), 001-024. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.174.1.1

Grimalt, M., Hernández, F., Legua, P., Almansa, M.S., Amorós, A., 2018. Physicochemical composition and antioxidant activity of three Spanish caper (*Capparis spinosa* L.) fruit cultivars in three stages of development. Sci Hort 240, 509-515. http://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.061

Grimalt, M., Legua, P., Hernández, F., Amorós, A., Almansa, M.S., 2019. Antioxidant activity and bioactive compounds contents in different stages of flower bud development from three Spanish caper (*Capparis spinosa*) cultivars. Horticultural J 88(3), 410-419. http://doi.org/10.2503/hortj.UTD-060

Gristina, A.S., Fici, S., Siragusa, M., Fontana, I., Garfì, G., Carimi, F., 2014. Hybridization in *Capparis spinosa* L.: molecular and morphological evidence from a Mediteranean island complex. Flora 209, 733-741. https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.09.002

Inocencio, C., Rivera. D., Alcaraz, F., Tomás-Barberán, F.A., 2000. Flavonoid content of commercial capers (*Capparis spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in Mediterranean countries. Eur Food Res And Technol 212, 70-74.

Kumaran, S.P., Kutty, B.C., Chatterji, A., Subrayan P.P., Mishra K.P., 2007 Radioprotection against DNA damage by an extract of Indian green mussel *Perna vidris* (L). J Eviron Pathol Toxicol Oncol 26: 263-272.

Mansour, R.B., Jilani, I.B.H., Bouaziz, M., Gargouri, B., Elloumi, N., Attia, H., Ghrabi-Gammar, Z,. Lassoued, S., 2016 Phenolic contents and antioxidant activity of ethanolic extract of *Capparis spinosa*. Cytotechnology. 68:135-142. http://doi.org/10.1007/s10616-014-9764-6

Mateo, G., Crespo, M.B., 1995. Flora abreviada de la Comunidad Valenciana. GAMMA ed. Alicante. Spain.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol 299, 152-178. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Tesoriere, L., Butera, D., Gentile, C., Livrea, A., 2007. Bioactive components of caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and antioxidant effects in a red meat simulated gastric digestion. J Agric Food Chem 55, 8465-8471. http://doi.org/10.1021/jf0714113

Tlili, N., Khaldi, A., Triki, S., Munne-Bosch, S., 2010 Phenolic compounds and vitamin antioxidant of caper (*Capparis spinosa*). Plant Foods Hum Nutr 65, 260-265. https://doi.org/10.1007/s11130-010-0180-6

Wang, Q., Zhang, M., Yin, L., 2016. Genetic diversity and population differentiation of *Capparis spinosa* (*Capparaceae*) in Northwestern China. Biochem Syst Ecol 66, 1-7. http://doi.org/10.1007/s12298-018-0518-3

Zohary, M., 1960. The species of *Capparis* in the Mediterranean and the Near Eastern countries. Bull Res Counc Isr 8, 49-64.

Sesión 2:

Horticultura, Citricultura, Fruticultura, Viticultura y Protección de Cultivos

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Influencia del envejecimiento sobre la composición volátil y sensorial del vino tinto

I. González-Sánchez, F. Burló y L. Noguera-Artiaga.

Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. de Beniel km 3,2, Orihuela, Alicante, España. e-mail: ignacio.gonzalez07@goumh.umh.es

Resumen

El vino es una de las bebidas más conocidas en el mundo. Se obtiene mediante la fermentación alcohólica, total o parcial, de la uva (*Vitis vinífera* L.). Desde un punto de vista químico, se puede decir que el vino es una solución hidroalcohólica constituida por diferentes sustancias que le atribuyen el color, sabor y aroma. Los factores más influyentes que inciden en la calidad del vino son: el estado de la uva con la que está elaborado, el tratamiento enológico aplicado, la crianza, el envejecimiento, la maduración y la evolución que experimenta como consecuencia de la transformación de sus compuestos. El objetivo de este estudio fue analizar las características fisicoquímicas, la composición volátil y las propiedades sensoriales de un vino tinto perteneciente a 5 añadas. Las características fisicoquímicas se estudiaron siguiendo los métodos oficiales de análisis de la Organización Internacional de la Viña y el Vino; el contenido de compuestos volátiles se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a detector de masas; y el análisis sensorial descriptivo se realizó empleando un panel entrenado en vino. Se encontraron diferencias significativas en 6 de las 9 propiedades fisicoquímicas analizadas; en 26 de los 40 compuestos volátiles encontrados se detectó una variación en la concentración; y respecto al análisis sensorial, se encontraron diferencias significativas en las fases de cata de vino olfativa, gustativa y global. Como resultado de lo anterior, podemos concluir que el tiempo de envejecimiento de este tipo de vino influyó sobre su calidad sensorial.

Palabras clave: Análisis sensorial descriptivo, Aroma, Añada, Calidad, Cromatografía de gases.

Influence of aging on the volatile and sensory composition of red wine

Abstract

Wine is one of the best known beverages in the world. It is obtained from the total or partial alcoholic fermentation of grapes (Vitis vinífera L.). From a chemical standpoint, it can be said that wine is a hydroalcoholic solution made up of different substances that provide colour, flavour and aroma. The most important factors affecting the quality of wine are the state of the grape from which it is made, the oenological treatment used, aging, maturation and the development it undergoes as a result of the transformation of its compounds. The objective of this study was to analyse the physicochemical characteristics, the volatile composition and the sensory properties of a red wine from 5 vintages. The physicochemical characteristics were studied following the official analysis methods of the International Organization of Vine and Wine; the content of the volatile compounds was determined by a gas chromatography combined with a mass detector; and the descriptive sensory analysis was carried out by a wine trained panel. Significant differences were found in 6 of the 9 physicochemical properties analysed; in 26 of the 40 volatile compounds found, a variation in the concentration was detected; while regarding the sensory analysis, significant differences were found in the olfactory, gustatory and overall wine tasting phases. As a result of the above, we can conclude that the aging of this type of wine influenced its sensory quality.

Keywords: Aroma, Descriptive sensory analysis, Gas chromatography, Quality, Vintage.

Introducción

El vino, que tiene un gran impacto económico y cultural en el mundo, sigue siendo una de las bebidas alcohólicas más populares (Genc et al., 2017). El proceso de elaboración del vino consiste en el cultivo y recolección de las uvas (*Vitis vinífera* L.), fermentación alcohólica del mosto, crianza y embotellado (Tao et al., 2014). El vino, está compuesto principalmente por agua, alcoholes, polioles, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados y compuestos polifenólicos, además de moléculas complejas de carbohidratos, incluidos polisacáridos y oligosacáridos provenientes de uvas, levaduras y bacterias durante la vinificación (Apolinar et al., 2021). Las cualidades del vino se ven afectadas por numerosos factores, como la variedad de uva utilizada, el clima, el suelo, la intensidad del cultivo, la posición de los brotes frutales, la disponibilidad de nutrientes y agua, las enfermedades y la madurez en el viñedo, la cosecha, el transporte de uvas, los procedimientos de elaboración y el envejecimiento del vino (Fernández et al., 2020). Por tanto, es fundamental conocer los procesos químicos que ocurren en cada etapa de la vinificación para favorecer las condiciones que conducen a la obtención de un producto de alta calidad.

Una vez completada la fermentación alcohólica, donde se generan la mayor parte de los compuestos aromáticos presentes en el vino (Ruíz et al., 2016), comúnmente, se sigue con el proceso de envejecimiento con el fin de mejorar la calidad final del mismo. Generalmente, la primera parte se realiza en barrica, mientras que la segunda parte del proceso se realiza en botellas. Durante todo el periodo, se producen cambios en las propiedades organolépticas del vino, además, se desarrollan compuestos de sabor y aromas nuevos y más complejos (Tudo y Toit, 2020). Los compuestos fenólicos o diferentes familias de compuestos volátiles como alcoholes, aldehídos o ésteres tienen un papel importante en las características organolépticas de los vinos. La combinación de ellos constituye el carácter del vino y diferencia un vino de otro (Ruíz et al., 2016).

La capacidad de envejecimiento o potencial de envejecimiento es un concepto utilizado por los expertos en cata de vinos para evaluar la capacidad que tiene un vino para conservar la calidad y la tipicidad durante el envejecimiento. No todos los vinos comparten la misma capacidad de envejecimiento, lo que indica el desarrollo a lo largo del tiempo de un bouquet de crianza característico (Le Menn et al., 2021). Actualmente, la industria del vino tiene un especial interés en la investigación sobre la mejora de la calidad del vino, con el fin de producir vinos que satisfagan las demandas y deseos de los consumidores. Sin embargo, esto requiere una comprensión de la compleja matriz química y la naturaleza de las interacciones entre los componentes moleculares del vino (Jones et al., 2021).

Para comprender los compuestos químicos presentes en el vino que influyen en la calidad de este, es necesario obtener información sobre sus características fisicoquímicas (pH, acidez, azúcares, grado de alcohol, polifenoles), su composición volátil, y su perfil sensorial. Por ello, el objetivo principal de este estudio es analizar las propiedades fisicoquímicas, la composición volátil y las características sensoriales descriptivas de un vino tinto elaborado durante 5 añadas con el fin de determinar si esta influye sobre su calidad final y, además, poder estimar el potencial de envejecimiento de este tipo de vino.

Material y Métodos

Se utilizaron 5 muestras para cada uno de los años incluidos en este estudio. Estas fueron elaboradas con variedades Monastrell, Alicante Bouschet y Syrah. Las vides de Monastrell tienen más de 50 años, mientras que las de Alicante Bouschet y Syrah, más de 10 años. Están plantadas en la zona interior de la provincia de Alicante, a una altitud promedio de 600 m s.n.m., en un suelo franco-calcáreo, de perfil profundo. La zona de cultivo tiene 3300 h de sol al año y una pluviometría de menos de 300 mm/año (ambos datos son resultado del promedio de los años bajo estudio).

Análisis fisicoquímicos

Los análisis relativos a las propiedades físicas y químicas de los vinos bajo estudio (la acidez total, acidez volátil, ácido acético, azúcares reductores, grado alcohólico total y adquirido, índice de polifenoles totales, pH y concentración de dióxido de azufre total) se realizaron siguiendo los métodos oficiales de análisis de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2021).

Análisis de compuestos volátiles

Para la determinación de compuestos volátiles se empleó un cromatógrafo de gases (GC2030, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA) acoplado a un detector de masas triple cuadrupolo (TQ8040 NX, Shimadzu Scientific Instruments), funcionando como un cuadrupolo simple en modo Q3 SCAN (40 - 400 m/z).

La extracción de los compuestos volátiles se realizó de acuerdo con el método de extracción en fase sólida en el espacio de cabeza (SPME), utilizando viales de cromatografía de 15 mL (provistos de tapón de aluminio y septum de PTFE/silicona). En cada vial se añadieron 10 mL de vino, 1 g de NaCl y 5 µL de acetato de bencilo (patrón interno, 1000 mg/L). Para la absorción de los compuestos se utilizó una fibra DVB/CAR/PDMS de 1 cm de longitud y 80 µL de grosor (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). La extracción se realizó durante 40 min a una temperatura de 40 ºC y agitación constante (250 rpm). El programa de temperatura del horno cromatográfico fue el siguiente: (i) 50 ºC, mantenidos durante 0,83 min; (ii) incremento de 2 ºC/min hasta 100 ºC; (iii) incremento de 3 ºC/min hasta 180 ºC; (iv) incremento de 20 ºC/min hasta 230 ºC, mantenidos durante 5 min. Las temperaturas de la fuente de ionización y la interfase fueron de 230 y 280 ºC, respectivamente. La desorción de los compuestos volátiles se llevó a cabo en el puerto de inyección durante 1 min a 230 ºC. La columna cromatográfica empleada fue una Sapiens X5MS (Teknokroma, Barcelona, España) de 30 m de longitud; 0,25 mm de diámetro interno; 0,25 µm de espesor. Se empleó un método de inyección mediante split (1:10), la presión en cabeza de columna fue de 18,6 kPa, el flujo total 9,6 mL/min (He) y el flujo de columna de 0,6 mL/min.

Para la identificación de los compuestos detectados se calcularon índices de retención en base a los tiempos de retención de alcanos comerciales (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), así como la biblioteca de índices de retención y espectros de masa NIST 17. Tan solo se identificaron aquellos compuestos con un índice de similitud > 90 % y una desviación con respecto a los índices calculados de ± 10 unidades.

Análisis sensorial

El análisis sensorial de las muestras bajo estudio se llevó a cabo empleando un panel entrenado compuesto por diez jueces sensoriales (4 hombres y 6 mujeres, de edades comprendidas entre 25 y 63 años) de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España) con más de 500 horas de experiencia en el análisis sensorial de vino.

El panel trabajó con el léxico de vino desarrollado por Issa-Issa et al. (2019) (16 descriptores positivos y 8 defectos), utilizando una escala hedónica desde 0 (intensidad no perceptible) hasta 10 (intensidad extremadamente elevada), empleando incrementos de 0,5 unidades (Tabla 1).

Las muestras se sirvieron codificadas con códigos de 3 dígitos, escogidos al azar, y en orden aleatorio siguiendo el método estadístico del cuadrado latino. Las fases olfativa y gustativa fueron realizadas en copa negra, mientras que para la fase visual se emplearon copas transparentes (ambas, catavinos oficiales). Se utilizó una sala de catas (medidas oficiales según norma UNE-EN ISO 8589:2010) en la que se disponía de luz natural y luz fluorescente, una temperatura de trabajo de 22 ºC y de agua osmotizada y colines a disposición de los panelistas. Todas las muestras se sirvieron a una temperatura de 15 ºC.

Tabla 1. Atributos positivos y defectos considerados en la valoración sensorial de los vinos.

Fases	Descriptores
Olfato-gustativa	Alcohol, Frutal, Floral, Vegetal, Especiado, Animal, Tostado
Gustativa	Dulce, Ácido, Amargo, Astringente
Global	Aristas, Persistencia
Visual	Limpidez, Color, Capa
Defectos†	Acidez volátil, Moho, Corcho, Oxidación, Pegamento, Azufre, Cuadra, Sulfhídrico

†Los defectos se evaluaron tanto en fase olfativa como gustativa.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rangos múltiples de Tukey empleando el software XLSTAT (versión 2014.1). La diferencia significativa fue definida como p <0,05.

Resultados y Discusión

Análisis fisicoquímico

Los valores de los parámetros fisicoquímicos analizados se recopilan en la Tabla 2. Se encontraron diferencias significativas en seis de los nueve parámetros analizados en las muestras de vino elaborado de distintas añadas. La acidez total, acidez volátil, grado alcohólico adquirido, grado alcohólico total y polifenoles totales tienden, en general, a ser mayores conforme más actual es la añada, por el contrario, la concentración de sulfuroso total es menor conforme más actual es la añada.

Tabla 2. Determinaciones físico-químicas en las muestras de vino elaborados en distinta cosecha.

Determinaciones	ANOVA†	2014	2015	2016	2017	2018
Acidez total (g/l Ácido tartárico)	**	6,37 c	6,48 b	6,70 a	6,55 b	6,65 a
Acidez volátil (g/l Ácido acético)	**	0,52 b‡	0,66 a	0,58 b	0,65 a	0,68 a
Ácido acético (g/l)	NS	0,41	0,48	0,54	0,50	0,55
Azúcares reductores (g/l glucosa)	NS	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
Grado alcohólico adquirido (% vol)	*	14,45 c	14,50 bc	14,60 ab	14,48 b	14,65 a
Grado alcohólico total (% vol)	*	14,40 c	14,50 b	14,80 a	14,50 b	14,85 a
Índice de polifenoles totales (UA)	**	43 b	52 a	49 ab	55 a	54 a
pH	NS	3,39	3,43	3,39	3,40	3,42
Sulfuroso total (mg/l)	**	51 a	49 a	45 b	42 b	44 b

† NS: no significativo; * y **, diferencias significativas $p \leq 0,05$ y 0,01, respectivamente. ‡ Letras distintas, dentro de una misma determinación, corresponden a diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0,05$, de acuerdo con la prueba de Tukey.

El etanol y el ácido son componentes básicos que fomentan el aroma, el sabor y el postgusto en el vino tinto. El contenido en etanol se modifica alterando la concentración de azúcar del juego de la uva durante la fermentación o la cosecha en diferente estadio de madurez de la fruta. La acidez se ajusta normalmente antes de la fermentación mediante la adición de ácido tartárico (Frost et al., 2017). Los polifenoles, presentes de forma natural en la uva y en el vino, inciden en sus propiedades organolépticas, en su capacidad de envejecimiento y en la vida útil del mismo (Vilas et al., 2019). Además, tienen un efecto potencialmente positivo sobre la salud humana, dando a la uva y al vino tinto propiedades funcionales (Giovinazzo y Griego, 2015). Fernández de Simón et al., (2006) también observaron esta tendencia decreciente conforme más envejecido era el vino. El sulfuroso es

utilizado como aditivo en la producción de vino por contener propiedades antioxidantes, antioxidasicas y antimicrobianas (Christofi et al., 2020). Este compuesto protege al vino contra el pardeamiento mediante la inactivación de enzimas de inhibición de la reacción de Maillard, y regula el crecimiento de levaduras y bacterias dañinas para el vino (Oliveira et al., 2011). Sin embargo, la concentración máxima de SO_2 permitida por la legislación en los vinos tintos es de 140 mg/L (Reglamento (CE) nº 607/2009). Esto es debido a que su presencia se ha relacionado con reacciones alérgicas en varios consumidores (Vally y Thompson, 2001).

Análisis de compuestos volátiles

En la Tabla 3 se presentan los diferentes compuestos volátiles identificados en el análisis, sus descriptores sensoriales, así como la concentración determinada. Se identificaron y cuantificaron un total de 40 compuestos volátiles, de los cuales 26 presentaron diferencias significativas. Entre ellos, destacan como compuestos mayoritarios el etanol, octanoato de etilo, acetato de etilo, 2-feniletanol, succinato de dietilo y decanoato de etilo. Durante el envejecimiento en botella, ocurren numerosos cambios químicos que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para la calidad del vino, como la formación de nuevos compuestos o el aumento o disminución de la concentración de compuestos ya presentes (Fernández de Simón et al., 2006). El etanol, componente principal del alcohol en el vino, tiende a disminuir conforme más antigua es la añada, al igual que el acetato de etilo, cuya cantidad se ve favorecida a mayor concentración de etanol (Duran et al., 2021). El etanol, influye en los perfiles sensoriales del vino aumentando el amargor, alterando la percepción de dulzura, suprimiendo la acidez, reduciendo la astringencia y el aroma frutal en los vinos, enmascarando la percepción de ésteres y aportando un carácter metálico y sensación de picor (King et al., 2013). Villamor, et al., (2013) estudiaron el efecto de las concentraciones de etanol sobre las propiedades sensoriales de los vinos tinto y, en general, concluyeron que un aumento en la concentración de etanol tuvo efectos significativos ($p \leq 0,05$) en la mayoría de los atributos, ya sea aumentando (aroma y sabor químico, leñoso, especiado, sabor amargo, sensación de ardor) o disminuyendo (aroma afrutado, floral, caramelo y sabor) en la percepción. La concentración de octanoato de etilo permanece relativamente constante durante las distintas añadas, a excepción de la añada de 2015, donde se produce un aumento significativo del mismo (5,086 mg/L). La concentración del decanoato de etilo no presenta una tendencia clara entre las añadas de 2015 y 2018, en cambio, se observa una disminución significativa en la añada de 2014. De otros estudios realizados con vinos embotellados se han obtenido resultados diversos. Garde et al., (2004) observaron que la concentración de octanoato de etilo disminuyó durante el envejecimiento, mientras que la concentración de decanoato de etilo aumentó. Gómez et al., (2011) realizaron una caracterización volátil y sensorial de vinos tintos durante cinco añadas consecutivas, obtuvieron una concentración de octanoato de etilo constante durante las cinco añadas y un aumento y posterior disminución significativa en la concentración de decanoato de etilo según envejecían las muestras de vino. En nuestro estudio, el succinato de dietilo aumenta significativamente conforme aumenta la antigüedad de las añadas, a excepción del año 2015, donde se produce una disminución considerable. Este dato concuerda con lo reportado por Castro et al., (2011) donde los niveles de succionato de dietilo aumentaron progresivamente como consecuencia de los equilibrios de hidrólisis-esterificación. El octanoato de etilo y el decanoato de etilo se consideran contribuyentes muy importantes en el aroma del vino, presentando olores flores y afrutados (Lorenzo et al., 2009). Ambos compuestos presentan concentraciones promedio por encima de su umbral de olor (0,58 y 0,50 mg/L, respectivamente) (Peinado et al., 2004). La concentración de 2-feniletanol tiende a ser mayor conforme más actual es la añada. Este compuesto se forma principalmente por el metabolismo de las levaduras (Gómez et al., 2011) y es el único alcohol fusel descrito con términos agradables como rosa, dulzón, pudiendo contribuir positivamente al aroma del vino (Lorenzo et al., 2009).

Tabla 3. Análisis de compuestos volátiles (mg/L) de las muestras de vino analizadas.

Compuesto	Descriptor	ANOVA	2014	2015	2016	2017	2018
Acetaldehído	Etéreo, café, vino	***	0,011 c‡	0,045 a	0,016 c	0,019 bc	0,033 ab
Etanol	Alcohólico	**	6,587 b	4,745 b	8,401 ab	13,943 a	13,428 a
Ácido acético	Vinagre	NS†	0,103	0,079	0,150	0,157	0,183
Acetato de etilo	Etéreo, anís, piña	**	1,225 bc	0,851 c	1,661 abc	2,177 a	1,940 ab
2-Metil-1-propanol	Afrutado, vino	NS	0,071	0,071	0,087	0,117	0,098
Propionato de etilo	Afrutado, piña, vino	*	0,008 ab	0,005 b	0,011 ab	0,013 a	0,012 a
Ácido 3-nitropropanoico		***	0,041 b	0,160 a	0,051 b	0,056 b	0,052 b
3-Metil-1-butanol	Aceitoso, whisky	NS	2,278	1,662	2,633	2,973	3,144
2-Metil-1-butanol	Vino, whisky	*	0,498 b	0,463 b	0,668 ab	0,777 a	0,828 a
Isobutirato de etilo	Manteca, fresa	***	0,105 a	0,007 c	0,027 bc	0,029 b	0,020 bc
2,3-Butanediol	Graso, afrutado	**	0,081 ab	0,017 b	0,076 ab	0,149 a	0,124 a
3-Metil-2-pentanol	Alcohol	***	0,023 a	0,004 b	0,026 a	0,031 a	0,022 a
Butirato de etilo	Etéreo, plátano, piña	NS	0,02	0,016	0,083	0,035	0,026
Lactato de etilo	Afrutado, manteca	*	0,105 ab	0,065 b	0,089 ab	0,110 a	0,111 a
Furfural	Almendra, amaderado	***	0,005 a	0,000 b	0,004 a	0,006 a	0,007 a
2-Metil butirato de etilo	Manzana, verde	**	0,027 a	0,008 b	0,015 b	0,013 b	0,013 b
Isopentanoato de etilo	Manzana	***	0,048 a	0,009 b	0,019 b	0,018 b	0,019 b
1-Hexanol	Herbáceo, amaderado	*	0,067 ab	0,037 b	0,065 ab	0,080 a	0,074 ab
Acetato de isoamilo	Plátano, pera	NS	0,152	0,150	0,106	0,149	0,100
2-Metil-butil acetato	Plátano, cacahuete	NS	0,027	0,021	0,017	0,021	0,020
Ácido hexanoico	Queso, graso	NS	0,008	0,008	0,013	0,015	0,012
Hexanoato de etilo	Manzana, piña	NS	0,454	0,501	0,415	0,566	0,296
Heptanoato de etilo	Melón, piña, ciruela	***	0,006 a	0,003 b	0,001 bc	0,000 c	0,000 c
Nonanal	Afrutado, floral	NS	0,012	0,003	0,413	0,101	0,105
2-Feniletanol	Miel, rosa	*	1,318 ab	0,802 b	1,356 ab	1,372 ab	1,606 a
Ácido octanoico	Aceitoso	***	0,007 c	0,021 bc	0,025 b	0,027 b	0,047 a
Succinato de dietilo	Afrutado, chocolate	***	1,721 a	0,532 c	1,163 b	1,227 b	0,893 bc
Octanoato de etilo	Albaricoque, pera	***	1,814 b	5,086 a	1,755 b	2,860 b	1,391 b
Fenilacetato de etilo	Afrutado, dulce, vino	**	0,008 a	0,002 c	0,006 ab	0,004 bc	0,006 ab
Acetato de feniletilo	Afrutado, miel, rosa	NS	0,017	0,017	0,023	0,013	0,018
β-Ionona	Floral, violeta	***	0,095 a	0,016 c	0,063 ab	0,027 bc	0,022 c
Nonanoato de etilo	Nuez, afrutado	NS	0,006	0,008	0,006	0,009	0,007
cis-Whiskylactona	Coco, verde	NS	0,011	0,002	0,014	0,02	0,018
TDN	Petróleo	***	0,021 a	0,003 c	0,013 b	0,005 c	0,000 c
Etil 9-decenoato	Afrutado, graso	***	0,008 b	0,055 ab	0,021 b	0,103 a	0,015 b
Decanoato de etilo	Uva, pera, graso	**	0,300 b	1,302 a	0,645 ab	1,556 a	0,779 ab
Isopentil succinato de etilo		NS	0,015	0,007	0,02	0,026	0,025
Octanoato de isoamilo	Afrutado, verde, dulce	*	0,002 b	0,015 a	0,008 ab	0,010 ab	0,006 ab
BHT		NS	0,073	0,017	0,031	0,025	0,012
Dodecanoato de etilo	Afrutado, floral, verde	***	0,002 c	0,009 c	0,025 bc	0,069 a	0,036 b
Total		*	17,378 b	16,822 b	20,222 b	28,909 a	25,549 ab
Familia química							
Aldehídos		*	0,028 c	0,048 c	0,433 a	0,126 b	0,146 b
Alcoholes		**	10,922 ab	7,801 b	13,312 ab	19,442 a	19,325 a
Ácidos carboxílicos		NS	0,186	0,289	0,258	0,276	0,313
Ésteres		NS	6,553	9,150	6,612	9,508	6,232
Norisoprenoides		***	0,116 a	0,018 c	0,076 ab	0,032 bc	0,022 c
Otros		***	0,073 a	0,017 b	0,031 b	0,025 b	0,012 b

† NS: no significativo; *, ** y ***, diferencias significativas $p \leq 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente. ‡ Letras distintas, para un mismo compuesto, corresponden a diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0,05$, de acuerdo con la prueba de Tukey.

El total de todos los compuestos volátiles cuantificados en el análisis se pueden agrupar en 6 familias químicas: aldehídos (3), alcoholes (8), ácidos carboxílicos (5), ésteres (21), norisoprenoides (2) y otros (1). Los alcoholes y ésteres fueron el grupo más grande de compuestos volátiles libres en los vinos analizados. La familia de los alcoholes, pueden reconocerse por su olor y sabor fuerte y penetrante. Se relacionan con notas herbáceas. Los ésteres, tienen un papel positivo en la generación de la calidad del aroma de estos vinos, especialmente los aromas frutales. Se observa una disminución significativa en la concentración de aldehídos conforme envejece la añada analizada. El acetaldehído, es el aldehído mayoritario del vino. Está formado principalmente por el metabolismo de las levaduras, y se asocia a aromas frutales y notas a frutos secos (Gómez et al., 2011). En la familia de los norisoprenoides se han identificado los compuestos β-ionona y TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno). Se observa una mayor concentración conforme más antigua es la añada. La β-ionona se caracteriza por tener notas florales, violetas. TDN es el norisoprenoide más estudiado en el vino debido a que está relacionado con el descriptor "petróleo" y es potencialmente negativo para la calidad del vino, salvo en aquellos de envejecimiento muy largo como los Fondillones y Oportos. El umbral de olor de este compuesto está en 20 µg/L (Mendes, 2009), presentando únicamente la muestra de la añada de 2014 un valor superior a dicho umbral.

Tabla 4. Análisis sensorial descriptivo de las muestras de vino elaboradas en distintas cosechas.

Descriptores	ANOVA†	2014	2015	2016	2017	2018
Fase olfativa						
Alcohol	NS	3,5	3,7	3,5	4,0	4,0
Frutal	***	6,0 b	6,0 b	6,2 ab	6,4 a	6,6 a
Floral	NS	1,2	1,0	1,3	1,1	1,2
Vegetal	NS	1,5	1,8	1,5	1,6	1,8
Especiado	**	2,0 c	1,9 c	2,2 b	2,2 b	2,4 a
Animal	NS	0,8	1,0	0,5	0,8	0,7
Tostado	**	1,5 c	1,8 b	1,7 b	2,0 a	2,1 a
Defectos	NS	0,20	0,15	0,25	0,10	0,15
Fase gustativa						
Alcohol	***	4,0 b	3,8 b	4,2 ab	4,4 a	4,5 a
Frutal	***	6,0 c	5,8 c	6,4 b	6,6 a	6,8 a
Floral	NS	1,5	1,0	1,4	1,2	1,4
Vegetal	NS	1,8	2,0	2,0	1,8	2,1
Especiado	**	2,5 ab	2,4 b	2,6 ab	2,8 a	2,8 a
Animal	NS	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5
Tostado	***	2,2 c	2,0 c	2,5 b	2,5 b	2,8 a
Dulce	NS	3,0	2,8	3,1	3,0	2,8
Ácido	NS	3,5	3,2	3,6	3,4	3,5
Amargo	NS	2,2	2,3	2,4	2,2	2,5
Astringente	NS	2,5	2,6	2,4	2,5	2,7
Defectos	NS	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2
Fase global						
Postgusto	***	4,5 b	4,6 b	4,8 ab	5,2 a	5,4 a
Aristas	NS	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
Fase visual						
Limpidez	NS	9,5	9,5	9,8	9,7	9,5
Color	NS	6,0	5,8	6,1	5,8	5,7
Capa	NS	6,5	6,5	5,8	5,9	6,0

† NS: no significativo; ** y ***, diferencias significativas $p \leq 0,01$ y 0,001, respectivamente.
‡ Letras distintas, dentro de un mismo descriptor, corresponden a diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0,05$, de acuerdo con la prueba de Tukey.

Análisis sensorial

Los resultados de la valoración sensorial se muestran en la Tabla 4. Se encontraron diferencias significativas en tres de las cuatro fases de cata de vino (olfativa, gustativa y global), no presentando diferencias en la fase visual. Según los resultados en el análisis de los compuestos volátiles, el aroma de los vinos se caracterizó por descriptores de aromas alcohol, frutal, miel, rosa, anís, miel, graso. Sin embargo, en el panel sensorial se encontraron algunas diferencias en los perfiles de aromas, siendo catalogados como frutal, especiado, tostado, alcohol. Generalmente, los vinos elaborados a partir de la cosecha de 2017 y 2018, presentaron una mayor intensidad del atributo frutal, tostado, especiado y alcohol en comparación con los vinos elaborados con añadas anteriores. Lo mismo ocurre con el atributo de la fase global "postgusto", siendo los vinos elaborados de las añadas de 2017 y 2018 los mejores puntuados. Muchos compuestos químicos están involucrados en la caracterización sensorial de los vinos, entre ellos, los fenólicos y los volátiles son los más involucrados en la identidad sensorial de los vinos (Valentin et al., 2020). En términos de características de sabor, el envejecimiento da como resultado la pérdida de aromas frutales, florales y vegetales, los llamados aromas primarios, y conduce al desarrollo de aromas terrosos, frutos secos, llamados aromas terciarios (Wang et al., 2021).Teniendo en cuenta la influencia del etanol en los perfiles sensoriales del vino, por su alteración en el atributo afrutado de los mismos, entre otros atributos, la concentración de etanol no fue una fuente significativa de variación dentro del análisis descriptivo. Por el contrario, la concentración de ésteres, cuya presencia se asocia principalmente con aromas frutales, impuso su aroma frutal en todas las muestras, siendo más intenso en las muestras de vino de añadas más recientes.

Conclusiones

La calidad del vino es el resultado de un conjunto complejo de interacciones. En base a los resultados obtenidos, el tiempo de envejecimiento del vino analizado influyó sobre su calidad sensorial y sobre su composición volátil, aunque esta última no arrojó resultados concluyentes debido a la variabilidad de los resultados. El vino tinto con más intensidad en los atributos sensoriales característicos de este producto es el elaborado con las añadas de 2017 y 2018. Estos vinos presentan una mayor intensidad en aromas frutales y en postgusto, además, se caracterizan por presentar una mayor acidez, un mayor grado alcohólico y un mayor índice de polifenoles que sus respectivos vinos elaborados de añadas anteriores. Cuando los vinos envejecen durante un cierto periodo, alcanzan su pico máximo, es decir, la máxima calidad del vino, siendo el momento idóneo para su consumo, posteriormente, van debilitándose. En este estudio, queda en evidencia que el potencial de envejecimiento de las muestras de vino analizadas tiene su máximo en las añadas de 2017 y 2018, es decir a los 3-4 años de su elaboración, siendo preferible el consumo de estos vinos respecto a los más envejecidos.

Bibliografía

Apolinar, R., Williams, P., Doco, T., 2021. Recent advances in the knowledge of wine oligosaccharides. Food Chemistry. 342, 128330. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128330.

Castro, L., Alañón, M.E., Calvo, E., Cejudo, M.J., Díaz, M.C., Pérez, M.S., 2011. Volatile compounds as markers of ageing in Tempranillo red wines from La Mancha D.O. stored in oak wood barrels. Journal of Chromatography A. 1218 (30), 4910-4917. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.094.

Christofi, S., Malliaris, D., Katsaros, G., Panagou, E., Kallithraka, S., 2020. Limit SO2 content of wines by applying High Hydrostatic Pressure. Innovative Food Science & Emerging Technologies 62, 102342. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102342.

Durán, E., Castro, R., García, M.d.V., Rodríguez, M.d.C., Schwarz, M., Guillén, D., 2021. Aroma of Sherry Products: A Review. Foods. 10, 753. https://doi.org/10.3390/foods10040753

Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Hernández, T., Estrella, I., 2006. Evolution of oak-related volatile compounds in a Spanish red wine during 2 years bottled, after aging in barrels made of Spanish, French and American oak wood. Analytica Chimica Acta. 563, 198-203. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.067.

Fernández, C., Pantano, N., Rossomando, F., Amicarelli, A., Scaglia, G., 2020. Fermentation monitoring by Bayesian states estimators. Application to red wines elaboration. Control Engineering Practice. 103, 104608. https://doi.org/10.1016/j.conengprac.2020.104608.

Frost, S., Harbertson, J.F., Heymann, H., 2017. A full factorial study on the effect of tannins, acidity, and ethanol on the temporal perception of taste and mouthfeel in red wine. Food Quality and Preference. 62, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.05.010.

Garde, T., Torrea, D., Ancín, C., 2004. Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with different composition. Journal of Food Engineering. 65, 349-356. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.032

Genc, M., Genc, S., Goksungur, Y., 2017. Exergy analysis of wine production: Red wine production process as a case study. Applied Thermal Engineering. 117, 511-521. https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2017.02.009.

Giovinazzo, G., Grieco, F., 2015. Functional properties of grape and wine polyphenols. Plant Food for Human Nutrition. 70, 454-462. https://doi.org/10.1007/s11130-015-0518-1.

Gómez, E., Sánchez, E., Gómez, M.A., González, M.A., 2011. Volatile and sensory characterization of red wines from cv. Moravia Agria minority grape variety cultivated in La Mancha region over five consecutive vintages. Food Research International. 44 (5), 1549-1560. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.022

Issa-Issa, H., Noguera-Artiaga, L., Sendra, E., Pérez-López, A.J., Burló, F., Carbonell-Barrachina, Á.A., López-Lluch, D., 2019. Volatile composition, sensory profile, and consumers' acceptance of Fondillón. Journal of Food Quality. 5981762. https://doi.org/10.1155/2019/5981762.

Jones, H.R., Jelley, R., Marango, M., Fedreizzi, B., 2021. The interactions of wine polysaccharides with aroma compounds, tannins, and proteins, and their importance to winemaking. Food Hydrocolloids. 107150. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107150.

King, E., Dunn, R., Heymann, H., 2013. The influence of alcohol on the sensory perception of red wines. Food Quality and Preference. 28, 235-243. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.08.013

Le Menn, N., Marchal, R., Demarville, D., Casenave, P., Tempere, S., Campbell, H., de Revel, G., Marchand, S. 2021. Development of a new sensory analysis methodology for predicting wine aging potential. Application to champagne reserve wines. Food Quality and Preference. 94, 104316. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104316.

Lorenzo, C., Garde, T., Pedroza, M.A., Alonso, G., Salinas M.R., 2009. Determination of fermentative volatile compounds in aged red wines by near infrared spectroscopy. Food Research International. 42 (9), 1281-1286. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.021

Mendes, M.M., 2009. Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma. Archives of Biochemistry and Biophysics. 483 (2), 236-245. https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008.

OIV. 2021. Compendium of international methods of wine and must analysis. Paris: International Organisation of Vine and Wine, Vol. 1.

Oliveira, C., Silva, A.C., De Freitas, V., Silva, A., 2011.Oxidation mechanisms occurring in wines. Food Research International. 44, 1115-1126. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050.

Peinado, R., Moreno, J., Bueno, J.E., Moreno, J.A., Mauricio, J.C., 2004. Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. Food Chemistry. 84 (4), 585-590. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00282-6.

Reglamento (UE) 607/2009 de la Comisión de 14 de julio de 2009, por el que se establecen determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 479/2008 del Consejo en lo que atañe a las denominaciones de origen e indicaciones geográficas protegidas, a los términos tradicionales, al etiquetado y a la presentación de determinados productos vitivinícolas. Diario Oficial de la Unión Europea L 193, 24 de julio de 2009, pp. 60-139.

Ruíz, M.J., Castro, R., Rodríguez, M.C., García, C., 2016. Volatile composition of Pedro Ximénez and Muscat sweet Sherry wines from sun and chamber dried grapes: a feasible alternative to the traditional sun-drying. Journal of Food Science and Technology. 53(6), 2519-2531. https://doi.org/10.1007/s13197-016-2192-1

Tao, Y., García, J.F., Wen, D., 2014. Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. Food Science and Nutrition. 54(6), 817-835. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.609949.

Tudo, J.L., du Toit, W. 2020. A chemometric approach to the evaluation of the ageing ability of red wines. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 203, 104067. https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104067.

Valentin, L., Barroso, L.P., Barbosa, R.M., de Paulo, G.A., Castro, I.A., 2020. Chemical typicality of South American red wines classified according to their volatile and phenolic compounds using multivariate analysis. Food Chemistry. 302, 125340. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125340.

Vally, H., Thompson, P.J., 2001. Role of sulfite additives in wine induced asthma: Single dose and cumulative dose studies. Thorax. 56, 763-769. http://dx.doi.org/10.1136/thorax.56.10.763.

Vilas, A., Valderrama, P., Fontes, N., Geraldo, D., Bento, F., 2019. Evaluation of total polyphenol content of wines by means of voltammetric techniques: Cyclic voltammetry vs differential pulse voltammetry. Food Chemistry. 276, 719-725. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.078.

Villamor, R., Evans, M.A., Ross, C.F., 2013. Effects of ethanol, tannin, and fructose concentrations on sensory properties of model red wines. American Journal of Enology and Viticulture. 64, 324-348. https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12118

Wang, Q.J., Niaura, T., Kantono, K., 2021. How does wine ageing influence perceived complexity? Temporal-Choose-All-That-Apply (TCATA) reveals temporal drivers of complexity in experts and novices. Food Quality and Preference. 92, 104230. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104230

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Efecto del aclareo y del dióxido de azufre sobre la calidad del vino tinto

A. Grao-Ruiz, J. Piernas-Párraga, P. J. Zapata y L. Noguera-Artiaga.

Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. de Beniel km 3,2, Orihuela, Alicante, España. e-mail: alberto.grao@goumh.umh.es

Resumen

El vino es una de las bebidas alcohólicas más consumidas en el mundo y una de las que mayor arraigo social y cultural presenta. De entre sus tipologías, el vino tinto es el producto más elaborado y consumido. En la zona del Mediterráneo español, la variedad con mayor acervo es la Monastrell, que destaca por su elevado nivel de taninos, sus propiedades organolépticas y su facilidad para adquirir una gran cantidad de azúcares. Con el fin de mejorar la calidad de las bayas para, de esta forma, incrementar la calidad del vino obtenido, se aplican muchos tratamientos precosecha. Uno de los más estudiados en los últimos años es el aclareo, que consiste en reducir la carga de bayas o racimos para que la planta redistribuya entre los granos restantes los nutrientes. El objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia de la práctica del aclareo sobre la calidad fisicoquímica, sensorial y aromática del vino tinto. Se elaboraron 3 vinos con uva procedente de distinta carga en racimo y se estudió el efecto de la adición de SO_2 en la calidad del producto final, mediante el análisis de los parámetros de calidad enológicos (acidez, grado alcohólico, azúcares reductores, etc.), la determinación de la composición volátil mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y un análisis sensorial descriptivo mediante un panel entrenado (23 descriptores positivos y 8 defectos). Se detectaron un total de 33 compuestos volátiles y se encontraron diferencias significativas en el análisis sensorial de las fases olfativa, gustativa, global y visual de las muestras, observando que la aplicación de aclareo, ya sea de racimos o de granos, influye positivamente en la calidad sensorial y aromática del vino tinto, favoreciendo la percepción de descriptores clave, como sabores tostados, dulces, especiados y vegetales. Por otro lado, se determinó que las muestras de vino cuyo procesado prescindió de la utilización de SO_2 mostraron un perfil sensorial más agradable que las muestras a las que este compuesto se adicionó.

Palabras clave: Análisis sensorial, Compuestos volátiles, Cromatografía de gases, Monastrell, SO_2.

Effect of thinning on red wine quality

Abstract

Wine is one of the most consumed alcoholic beverages in the world and one of those with the greatest social and cultural roots. Among its typologies, red wine is the most elaborated and consumed product. In the Spanish Mediterranean area, the variety with the greatest collection is Monastrell, which stands out for its high level of tannins, its organoleptic properties, and its ease of acquiring sugars. To improve the quality of the berries and thus increase the quality of the wine obtained, many pre-harvest treatments are applied. One of the most studied in recent years is thinning, which consists of reducing the berry load so that the plant redistributes the nutrients among the remaining grains. The objective of the present study was to evaluate the influence of thinning practice on the physicochemical, sensorial, and aromatic quality of red wine. 3 wines were made with grapes from different clusters and the effect of the addition of SO_2 on the quality of the final product was studied, by analyzing the oenological quality parameters (acidity, alcoholic degree, reducing sugars, etc.), the determination of the volatile composition by gas chromatography coupled to mass spectrometry, and a descriptive sensory analysis by means of a trained panel (23 positive descriptors and 8 defects). A total of 33 volatile compounds were detected and significant differences were found in the sensory analysis of the olfactive, gustative, global, and visual phases, obtaining that the application of thinning, whether of bunches or grains, positively influences the sensory and aromatic quality of red wine, favoring the perception of key descriptors, such as roasted, sweet, spicy, and vegetable flavors. On the other hand, it was determined that the wine samples whose processing dispensed with the use of SO_2 showed a more pleasant sensory profile than those to which this compound was added.

Keywords: Gas chromatography, Monastrell, Sensory analysis, SO_2, Volatile compounds.

Introducción

El vino es una de las bebidas alcohólicas más populares. Las estimaciones de la producción mundial de vino en el año 2020 se fijan en torno a 258 millones de hectolitros, una tendencia al alza en las últimas décadas, con Italia, Francia y España como los principales países productores. Por otro lado, Estados Unidos y Francia se mantienen como los principales consumidores de vino en el mundo, con un estimado de 30 y 24,7 millones de hectolitros consumidos en 2020, respectivamente. El sector vinícola actual se caracteriza por su diversificación tanto de productos como de uvas utilizadas en su elaboración. La variedad de uva Monastrell, la más importante en las Denominaciones de Origen de Alicante, Yecla, Jumilla, Bullas y las Islas Baleares en España, ha experimentado una demanda importante durante los últimos años, distinguiéndose por su elevado contenido en azúcares, pigmentación y grado alcohólico.

El concepto de calidad del vino, más allá de sus efectos saludables, es muy complejo: varios aspectos, desde las características organolépticas del producto hasta el proceso de elaboración, precio u origen, influyen en los gustos y preferencias del consumidor (Hopfer y Heymann, 2014), a los que habría que añadir, desde un punto de vista técnico, otros factores de carácter fisicoquímico y composicional, como el grado alcohólico, la acidez, los niveles de SO_2, el contenido de azúcares reductores, etc. (Rasines-Perea et al., 2015). De todos ellos, el aroma se considera uno de los factores de mayor peso a la hora de valorar la calidad del vino (Petronilho et al., 2020).

Los compuestos aromáticos de la uva se encuentran generalmente en su forma libre y reciben el nombre de compuestos volátiles. Estos pueden hallarse originalmente en el fruto o bien formarse durante el proceso de fermentación y maduración del mosto. Pueden encontrarse a su vez otros componentes no volátiles, como son los azúcares conjugados; si bien la influencia del aroma sobre la calidad del vino se debe en gran parte al efecto combinado de los primeros, principalmente alcoholes, aldehídos, ésteres, ácidos y otros componentes menores, como sesquiterpenos y norisoprenoides (Condurso et al., 2016).

El tipo y concentración de compuestos volátiles, y por ende la calidad del producto, puede depender a su vez de factores como el medio ambiente, la variedad de uva, la vinificación y el envejecimiento o las prácticas culturales (Condurso et al., 2016). Dentro de estas últimas destaca el aclareo o raleo, ya sea de racimos o de granos, por su efecto sobre la composición del fruto, habiéndose relacionado con un aumento del color, sabor y concentración de azúcares (Tardaguila et al., 2008).

Si, actualmente, prácticas como el aclareo están ganando progresivamente relevancia de cara a la calidad de los vinos, otras técnicas como el uso de dióxido de azufre (SO_2), han empezado a ser cuestionadas. La utilización de SO_2 en vinos conlleva la formación de sulfitos, potenciales responsables de afecciones y alergias como dermatitis, diarrea, y dificultades respiratorias (Vally, Misso y Madan, 2009), lo que unido a un posible efecto negativo sobre el perfil organoléptico del vino han generado especial atención ante la posibilidad de prescindir de esta etapa o bien sustituirla por técnicas de conservación alternativas.

El objetivo del presente estudio es evaluar la influencia de la práctica del aclareo sobre la calidad fisicoquímica, sensorial y aromática del vino tinto elaborado a partir de uvas variedad Monastrell, así como estudiar el efecto de la adición de SO_2 sobre el perfil sensorial del producto final.

Material y Métodos

Tratamientos, selección y muestreo

La parcela objeto de estudio se encuentra situada en el paraje de la Venta del Pino (Cehegín). Se trata de un viñedo de Monastrell de unos 48 años y cultivado en vaso, sobre portainjertos R-110 y 161-49c, a unos 750 m s.n.m., orientado al sur y sobre suelos arcillo-calcáreos de formación aluvial. Este estudio se corresponde a la añada 2018, en la que la vendimia tuvo lugar la última semana de septiembre. El cultivo es ecológico y la recolección se realizó de manera manual en cajas de 15 kilos.

Los diferentes vinos se elaboraron de manera separada en depósitos de 1000 kilos y mediante fermentación espontánea.

A fin de determinar la influencia de la aplicación del aclareo en las vides sobre la calidad final del vino tinto, las muestras, de 0,75 L, se distribuyeron en tres lotes para la realización de los ensayos, , a razón de 6 muestras cada uno: un lote Control, C, constituido por muestras de vino tinto obtenidas de vides no tratadas con aclareo; un segundo lote, AC, compuesto por muestras de vino elaborados a partir de vides a las que se aplicó una reducción de racimos al 50 %; y un tercer lote, AG, cuyas muestras se elaboraron a partir de vides a las que se realizó un 50 % de reducción de granos en cada racimo. Adicionalmente, para comprobar el efecto del SO_2 sobre las características sensoriales del producto, 3 de cada 6 muestras incluidas en cada lote fueron adicionadas de este compuesto. Todas las muestras se conservaron y sirvieron en las mismas condiciones de cara a la realización de los análisis fisicoquímicos y sensoriales pertinentes.

Análisis fisicoquímico

La acidez total y volátil, concentración de ácido acético, niveles de azúcares reductores, grado alcohólico total y adquirido, índice de polifenoles totales, pH y concentración de dióxido de azufre total (SO_2) se determinaron de acuerdo con los métodos oficiales de análisis de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2021).

Análisis de compuestos volátiles

La determinación de compuestos volátiles se realizó empleando un cromatógrafo de gases (GC2030, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA) acoplado a un detector de masas triple cuadrupolo (TQ8040 NX, Shimadzu Scientific Instruments), aunque, para la realización de estas determinaciones, el equipo funcionó como un cuadrupolo simple en modo Q3 SCAN (40 - 400 m/z). Para la extracción de compuestos volátiles se empleó el método de extracción en fase sólida en el espacio de cabeza, utilizando viales de cromatografía de 15 mL (provistos de tapón de aluminio y septum de PTFE/silicona). En estos, se añadieron 10 mL de vino, 1 g de NaCl y 5 µL de acetato de bencilo (patrón interno, 1000 mg/L). Para la absorción de los compuestos se utilizó una fibra DVB/CAR/PDMS de 1 cm de longitud y 80 µL de grosor (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). La extracción se realizó durante 40 min a una temperatura de 40 ºC y agitación constante (250 rpm). La desorción de los compuestos volátiles se llevó a cabo en el puerto de inyección durante 1 min a 230 ºC. Las temperaturas de la fuente de ionización y la interfase fueron de 230 y 280 ºC, respectivamente. La columna cromatográfica empleada fue una Sapiens X5MS (Teknokroma, Barcelona, España) de 30 m de longitud; 0.25 mm de diámetro interno; 0.25 µm de espesor. Se empleó un método de inyección mediante *split* (1:10), la presión en cabeza de columna fue de 18,6 kPa, el flujo total 9,6 mL/min (He) y el flujo de columna de 0,6 mL/min. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: (i) 50 ºC, mantenidos durante 0,83 min; (ii) incremento de 2 ºC/min hasta 100 ºC; (iii) incremento de 3 ºC/min hasta 180 ºC; (iv) incremento de 20 ºC/min hasta 230 ºC, mantenidos durante 5 min. Para la identificación de los compuestos detectados se calcularon índices de retención en base a los tiempos de retención de alcanos comerciales (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), así como la biblioteca de índices de retención y espectros de masa NIST 17. Tan solo se identificaron aquellos compuestos con un índice de similitud > 90 % y una desviación máxima con respecto a los índices calculados de ± 10 unidades.

Análisis sensorial

Se efectuó un estudio sensorial descriptivo de los vinos mediante panel entrenado, compuesto por ocho jueces sensoriales (4 hombres y 4 mujeres, de edades comprendidas entre 24 y 60 años) de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España) con más de 500 horas de experiencia en el análisis sensorial de vino. Las muestras se sirvieron de forma individualizada, identificadas mediante códigos de 3 dígitos escogidos al azar, en orden aleatorio siguiendo el método estadístico del cuadrado latino y a una temperatura de 15 ºC. Las fases olfativa y gustativa fueron realizadas en copa negra, mientras que para la fase visual se emplearon

copas transparentes (ambas, catavinos oficiales). Entre cada una de las muestras se puso a disposición de los panelistas agua osmotizada y galletas sin sal, para limpiar el paladar. La sala de catas disponía de una combinación de luz natural y luz no natural (fluorescente) y se fijó una temperatura de 22 ºC durante el análisis.

El panel trabajó con el léxico desarrollado por Issa-Issa et al. (2019), que incluye un total de 23 descriptores positivos y 8 defectos correspondientes a las fases olfativa, gustativa, global y visual de las muestras (Tabla 1), utilizando para cada uno de ellos una escala hedónica desde 0 (intensidad no perceptible) hasta 10 (intensidad extremadamente elevada), empleando incrementos de 0,5 unidades.

Tabla 1. Atributos y defectos considerados en la valoración sensorial de los vinos estudiados

Fases de la evaluación sensorial				
Olfativa	**Gustativa**	**Global**	**Visual**	**Defectos†**
Alcohol	Alcohol	Aristas	Limpidez	Acidez volátil
Frutal	Frutal	Persistencia	Color	Moho
Floral	Floral		Capa	Corcho
Vegetal	Vegetal			Oxidación
Especiado	Especiado			Pegamento
Animal	Animal			Azufre
Tostado	Tostado			Cuadra
	Dulce			Sulfhídrico
	Ácido			
	Amargo			
	Astringente			

†Los defectos se evaluaron tanto en fase olfativa como gustativa.

Análisis estadístico

Para el estudio de las diferencias entre la muestra control y aquellas tratadas con aclareo y SO_2, se realizaron un análisis de varianza (ANOVA monofactorial) y una prueba de rangos múltiples de Tukey, empleando el software XLSTAT (versión 2014.1). La diferencia significativa fue definida como p <0,05.

Resultados y Discusión

Análisis fisicoquímico

Al evaluar el perfil fisicoquímico de los vinos se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros estudiados, excepto en el pH y la acidez total (Tabla 2). La concentración de ácido acético fue mayor en las muestras procedentes de aclareo, siendo AG el lote que mayor concentración presentó. Los vinos pertenecientes a los lotes AC y AG mostraron un grado alcohólico, tanto total como adquirido, y un índice de polifenoles totales notablemente superiores al lote Control, así como una concentración de SO_2 relativamente menor, sin llegar a diferenciarse estadísticamente entre ellos. Por otra parte, el tratamiento de aclareo en grano indujo un aumento en el contenido de azúcares reductores y la acidez volátil del vino. En contraste, el efecto observado de la reducción de racimos sobre este último parámetro no difirió significativamente respecto a los resultados de los lotes Control y AG.

A la hora de valorar la relación del perfil fisicoquímico del vino con su calidad sensorial, se ha especificado que algunos de los parámetros aquí tratados, como la concentración de polifenoles, la acidez volátil o el contenido alcohólico, influyen negativamente sobre la apreciación sensorial del producto; esto puede observarse más notablemente en el caso de consumidores jóvenes, más sensibles a las variaciones en el perfil sensorial de los alimentos (Mora et al., 2021).

Tabla 2. Determinaciones fisicoquímicas en las muestras de vino elaboradas mediante uva control (C), obtenida mediante reducción de racimos (AC) y mediante reducción de granos (AG)

Determinaciones	ANOVA†	C	AC	AG
Acidez total (g/l Ácido Tartárico)	NS	6,57	6,38	6,7
Acidez volátil (g/l Ácido acético)	*	0,59 b‡	0,76 ab	0,82 a
Ácido acético (g/l)	*	0,30 c	0,53 b	0,61 a
Azúcares reductores (g/l Glucosa)	*	<1,5 b	<1,5 b	2,1 a
Grado alcohólico adquirido (% vol)	*	13,57 b	14,50 a	14,75 a
Grado alcohólico total (% vol)	*	13,6 b	14,5 a	14,8 a
Índice de polifenoles totales (UA)	**	43 b	50 a	52 a
pH	NS	3,39	3,43	3,39
Sulfuroso total (mg/l)	**	55 a	48 b	45 b

† NS: no significativo; * y **, diferencias significativas $p \leq 0,05$ y 0,01, respectivamente. ‡ Letras distintas, dentro de una misma determinación, corresponden a diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0,05$ (prueba de Tukey).

Determinación de compuestos volátiles

Se identificaron y cuantificaron 33 compuestos volátiles en las muestras de vino bajo estudio y se encontraron diferencias estadísticamente significativas en 15 de estos (Tabla 3). El grupo de compuestos que en mayor porcentaje se encontró fue el de los ésteres (21 compuestos), seguido de alcoholes (7), aldehídos (3), ácidos carbóxilicos (1) y norisoprenoides (1). Sin embargo, si analizamos los resultados en función de la concentración, los alcoholes fueron los que mayor cantidad aportaron (~10,4 mg/L), seguido de los ésteres (~5,1 mg/L). A nivel individual, los compuestos que fueron encontrados en mayor concentración fueron etanol (~7,2 mg/L), 3-metil-1-butanol (~1,7 mg/L), succinato de dietilo (~1,6 mg/L), acetato de etilo (~1,3 mg/L) y fenil etil alcohol (~1,1 mg/L). Estos son compuestos típicos encontrados en vinos elaborados con la variedad Monastrell, como la empleada en este estudio (Issa-Issa et al., 2019).

La realización de un aclareo en el cultivo de la uva, ya sea en racimos o en granos, conduce a vinos con una mayor concentración en compuestos aromáticos (14,8 mg/L en la muestra Control frente a 15,9 mg/L en el caso de las muestras AC y AG). Las muestras procedentes de uva de aclareo tuvieron una mayor concentración de alcoholes y una menor concentración de ésteres que la muestra Control. Este incremento en los alcoholes se debe principalmente a una mayor concentración de etanol (C= 6,5 mg/L; AC y AG 7,7 y 7,2 mg/L, respectivamente). Se puede comprobar que, en ninguno de los compuestos relacionados con la crianza, como por ejemplo 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, butirolactona, o succinato de dietilo, se encontraron diferencias significativas, por lo que es un claro indicativo de que las diferencias encontradas en el estudio se deben al tratamiento realizado en campo y no al proceso enológico.

Es necesario puntualizar que las diferencias encontradas a nivel individual en cada compuesto no tienen por qué tener relación directa con la percepción sensorial de estas, pues en la misma influyen los umbrales de detección, así como de las sinergias y/o antagonismos resultantes.

Tabla 3. Análisis de compuestos volátiles (mg/L) de las muestras de vino elaboradas mediante uva control (C), obtenida mediante reducción de racimos (AC) y mediante reducción de granos (AG)

Compuesto	Familia	Descriptor	ANOVA†	C	AC	AG
Etanol	Alcoholes	Alcohol	**	6,531 a‡	7,779 b	7,234 ab
Acetato de etilo	Ésteres	Anisado, Piña	***	1,235 a	1,403 b	1,484 b
2-Metil-1-propanol	Alcoholes	Afrutado, Vino	**	0,096 b	0,095 b	0,082 a
3-Metil-1-butanol	Alcoholes	Aceite, Whisky	NS	1,538	1,639	1,843
2-Metil-1-butanol	Alcoholes	Tostado, Afrutado, Whisky	NS	0,155	0,208	0,085
Isobutirato de etilo	Ésteres	Cítrico, Fresa	***	0,022 b	0,020 ab	0,015 a
Acetato de butilo	Ésteres	Plátano, Afrutado, Verde	NS	0,005	0,006	0,005
2,3-Butanediol	Alcoholes	Afrutado, Cremoso, Graso	NS	0,065	0,174	0,277
Butirato de etilo	Ésteres	Plátano, Piña, Dulce	NS	0,014	0,014	0,052
Lactato de etilo (L)	Ésteres	Mantecoso, Afrutado	**	0,145 a	0,166 a	0,281 b
Etil 2-metilbutirato	Ésteres	Afrutado, Verde, Dulce	***	0,014 b	0,011 ab	0,009 a
Etil isovalerato	Ésteres	Manzana	NS	0,014	0,013	0,014
1-Hexanol	Alcoholes	Verde, Madera, Dulce	**	0,018 a	0,035 b	0,039 b
Acetato de isoamilo	Ésteres	Plátano, Pera, Dulce	NS	0,070	0,123	0,152
y-Butirolactona	Ésteres	Caramelo	NS	0,018	0,024	0,031
Hexanoato de etilo	Ésteres	Manzana, Plátano, Piña	NS	0,235	0,195	0,180
Nonanal	Aldehídos	Afrutado, Grasa, Floral	NS	0,010	0,011	0,011
Fenil etil alcohol	Alcoholes	Miel, Floral, Rosa	NS	1,003	1,169	1,169
Succinato de etilo	Ésteres	Afrutado, Manzana, Floral	NS	0,051	0,103	0,181
Ácido octanoico	Ác. Carbox.	Aceitoso, Queso	NS	0,023	0,019	0,013
Succinato de dietilo	Ésteres	Afrutado, Chocolate, Terroso	NS	1,631	1,539	1,749
Octanoato de etilo	Ésteres	Afrutado, Floral	**	1,259 b	0,762 a	0,605 a
2-Fenil etil acetato	Ésteres	Miel, Afrutado, Floral	NS	0,011	0,015	0,015
B- ionona	Norisop.	Floral, Afrutado	NS	0,017	0,012	0,012
Nonanoato de etilo	Ésteres	Aceitoso, Afrutado, Nuez	**	0,004 b	0,002 a	0,001 a
Decanoato de etilo	Ésteres	Uva, Aceitoso, Pera	***	0,418 b	0,212 a	0,175 a
Dodecanal	Aldehídos	Herbal, Cera, Floral	***	0,007 b	0,000 a	0,000 a
Etil isopentil succinato	Ésteres	No encontrado	NS	0,025	0,021	0,026
Octanoato de isoamilo	Ésteres	Coco, Verde, Afrutado	***	0,007 b	0,005 a	0,004 a
Dodecanoato de etilo	Ésteres	Verde, Afrutado, Floral	**	0,010 b	0,004 a	0,004 a
1-Tetradecanal	Aldehídos	Graso, Incienso, Almizcle	***	0,003 b	0,000 a	0,000 a
Tetradecanoato de etilo	Ésteres	Cera, Jabón	NS	0,012	0,009	0,013
Hexadecanoato de etilo	Ésteres	Cera	**	0,144 a	0,205 b	0,188 ab
		Familias				
		Alcoholes	**	10,353 a	11,192 b	10,603 ab
		Ésteres	**	5,932 b	5,342 ab	4,633 a
		Aldehídos	**	0,025 b	0,011 a	0,011 a
		Ácidos carboxílicos	NS	0,025	0,014	0,018
		Norisoprenoides	NS	0,020	0,012	0,011
		Total	**	14,809 a	15,990 b	15,947 b

† NS: no significativo; ** y ***, diferencias significativas $p \leq 0,01$ y 0,001, respectivamente. ‡ Letras distintas, para un mismo compuesto, corresponden a diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0,05$, de acuerdo con la prueba de Tukey.

Análisis sensorial

La utilización de SO_2 en la elaboración de los vinos estudiados contribuyó a una mayor percepción de los olores Vegetal y Animal, así como del sabor Ácido, en comparación con los vinos cuya elaboración prescindió del uso de este compuesto. En estos últimos se notificó una mayor persistencia de los olores Frutal, Floral y Tostado, así como de los descriptores gustativos Frutal, Floral, Tostado, Dulce y Postgusto y el atributo visual Capa (Figura 1). No pudo establecerse una distinción notable entre ambos tratamientos respecto a los olores Alcohol y Especiado, los sabores Alcohol, Vegetal, Especiado, Animal, Amargo y Astringente, y los descriptores visuales Limpidez y Color.

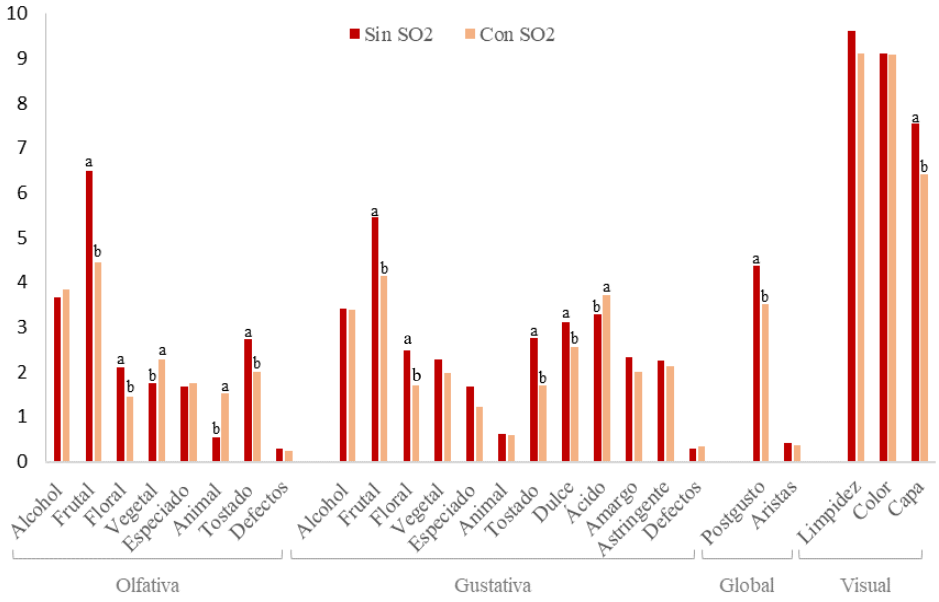


Figura 1. Análisis sensorial descriptivo de las muestras de vino elaboradas con y sin SO_2 (Letras distintas corresponden a diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0{,}05$, de acuerdo con la prueba de Tukey en ese descriptor sensorial)

Hasta ahora, la adición de SO_2 se considera una práctica imprescindible en la elaboración del vino tinto, contribuyendo a la disolución de componentes minerales y a la obtención de compuestos de interés como ácidos orgánicos, antocianinas o taninos, estos últimos responsables del color del vino (Ribereau-Gayon et al., 2002), así como por su papel como antimicrobiano (Goode y Harrop, 2011). Esta práctica no queda exenta, sin embargo, de inconvenientes: el riesgo de toxicidad y deterioro organoléptico derivado de la adición de SO_2 durante el proceso de elaboración del vino tinto ha motivado la búsqueda de tratamientos alternativos para su reducción o eliminación (Yildirim y Darici, 2020). Se ha relacionado la reducción en el uso de SO_2 con un mantenimiento e incluso mejora de la calidad organoléptica del producto, tanto al concluir el proceso de vinificación como durante la crianza en botella, señalando un mayor cuerpo, intensidad y astringencia (Esparza et al., 2020).

Varios autores han notificado que prácticas agrarias como el aclareo de racimos contribuyen a una mejora en el perfil sensorial del vino (Vaquero-Fernández et al., 2009). Di Profio et al. (2011) señalaron que la aplicación de aclareo de racimos contribuía a una mejora en la percepción de varios descriptores de aroma y retronasales, como los florales y especiados. En la misma línea, Roberts, Reynolds y De Savigny (2007) notificaron una mayor intensidad de los sabores frutal y floral en vinos derivados de cepas Sauvignon Blanc y Chardonnay Musqué a las que se aplicó esta práctica. Otros atributos señalados incluyen la astringencia, amargura y persistencia (Avizcuri-Inac et al., 2013).

Ahondando en el estudio que aquí nos ocupa, la aplicación de aclareo, ya sea en racimos o en granos, ha demostrado tener incidencia sobre las características de los vinos (Tabla 4). De los 23 descriptores sensoriales analizados, se encontraron diferencias significativas en 11 de ellos respecto al lote Control. En los vinos procedentes de cultivo en los que se ha realizado un aclareo se percibieron con mayor intensidad los descriptores Alcohol, Vegetal y Tostado, así como los sabores Especiado y Dulce. Si analizamos las diferencias entre los tratamientos de forma individualizada, AC presentó un mayor olor a Tostado y una mayor Capa, mientras que AG mostró intensidades mayores de Vegetal, Postgusto, y Acidez. No se encontraron diferencias significativas en los descriptores sensoriales Frutal, Floral y Animal, así como tampoco se reportaron para el olor Especiado y los sabores Amargo y Astringente, la percepción de Aristas y/o Defectos, ni el Color de las muestras. Este último aspecto contrasta con lo descrito en trabajos similares relativo a que el aclareo de racimos ejerce una especial influencia sobre los compuestos responsables del color del vino, habiéndose observado un aumento tanto de la

intensidad de color como del matiz en vinos derivados de cepas a las que se aplicó aclareo de racimos (Gil-Muñoz, Vila-López y Martínez-Cutillas, 2009), debido posiblemente al aumento de la relación superficie / volumen del fruto, favoreciendo la extracción de compuestos de la piel (Barbagallo, Guidoni y Hunter, 2011).

De acuerdo con los resultados descritos, podemos afirmar que la aplicación de tratamientos de aclareo durante el cultivo de la vid permite obtener vinos con una mayor complejidad aromática y gustativa, debido al incremento de determinados descriptores sensoriales relacionados con notas vegetales, tostadas y especiadas.

Tabla 4. Análisis sensorial descriptivo de las muestras de vino elaboradas mediante uva control (C), obtenida mediante reducción de racimos (AC) y mediante reducción de granos (AG)

Descriptores	ANOVA†	C	AC	AG	Descriptores	ANOVA†	C	AC	AG
Fase olfativa					*Fase gustativa*				
Alcohol	***	3,31 a‡	3,75 ab	4,22 b	Alcohol	**	2,78 a	3,62 b	3,81 b
Frutal	***	5,94 a	5,19 a	5,31 a	Frutal	***	4,97 a	5,12 a	4,31 a
Floral	NS	1,81	1,50	2,03	Floral	NS	2,16	2,00	2,12
Vegetal	**	1,81 a	1,63 a	2,62 b	Vegetal	**	1,68 a	2,34 b	2,37 b
Especiado	NS	1,53	1,81	1,81	Especiado	***	0,85 a	1,78 b	1,68 b
Animal	***	0,91 a	1,00 a	1,18 a	Animal	NS	0,33	0,78	0,75
Tostado	***	1,22 a	3,72 c	2,18 b	Tostado	***	1,71 a	2,62 b	2,31 ab
Defectos	NS	0,13	0,11	0,15	Dulce	**	2,47 a	3,31 b	2,75 ab
Fase global					Ácido	***	4,31 b	2,31 a	3,87 b
Postgusto	***	3,75 a	3,28 a	4,81 b	Amargo	**	1,93 a	2,34 a	2,21 a
Aristas	NS	0,31	0,41	0,21	Astringente	NS	1,90	2,59	2,06
Fase visual					Defectos	NS	0,18	0,20	0,13
Limpidez	NS	9,00	9,63	9,50					
Color	NS	8,81	9,18	9,31					
Capa	***	6,50 a	7,56 b	6,87 a					

† NS: no significativo; ** y ***, diferencias significativas $p \leq 0,01$ y 0,001, respectivamente. ‡ Letras distintas, dentro de una misma determinación, corresponden a diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0,05$, de acuerdo con la prueba de Tukey.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, puede concluirse que la práctica del aclareo durante el cultivo de la vid, ya sea de racimos o de granos, influye significativamente en la calidad del vino tinto. Esta técnica mejora el perfil aromático y sensorial, incrementando las intensidades de descriptores clave relacionados con notas tostadas, dulces, especiadas o vegetales. En lo que respecta al efecto de la adición de SO_2 sobre las características aromáticas y sensoriales del vino, se determinó que las muestras de vino cuyo procesado incluyó la utilización de este compuesto mostraban una mayor percepción de atributos sensoriales no deseables, mientras que los vinos elaborados prescindiendo del uso de este presentaron un perfil organoléptico más agradable. Por tanto, las técnicas estudiadas en este trabajo podrían influir en una mejor apreciación del producto final por parte del consumidor y ser de interés para el desarrollo de futuras investigaciones en este campo. Es necesario mencionar que, para obtener unas conclusiones más sólidas, sería necesario repetir estas determinaciones durante varios años en ensayos similares para minimizar el posible efecto debido a la añada y la respuesta de la planta a estos tratamientos.

Bibliografía

Avizcuri-Inac, J.M., Gonzalo-Diago, A., Sanz-Asensio, J., Martínez-Soria, M.T., López-Alonso, M., Dizy-Soto, M., Echávarri-Granado, J.F., Vaquero-Fernández, L., Fernández-Zurbano, P., 2013. Effect of Cluster Thinning and Prohexadione Calcium Applications on Phenolic Composition and Sensory Properties of Red Wines. J. Agric. Food Chem. 61 (5), 1124-1137. https://doi.org/10.1021/jf304257r.

Barbagallo, M.G., Guidoni, S., Hunter, J.J., 2011. Berry size and qualitative characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah. S Afr J. Enol. Vitic. 32, 129–136. https://doi.org/10.21548/32-1-1372.

Condurso, C., Cincotta, F., Tripodi, G. et al., 2016. Effects of cluster thinning on wine quality of Syrah cultivar (*Vitis vinifera* L.). Eur. Food Res. Technol. 242, 1719–1726. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2671-7.

Di Profio, F., Reynolds, A. G., Kasimos, A., 2011. Canopy management and enzyme impacts on Merlot, Cabernet franc, and Cabernet Sauvignon. II. Wine composition and quality. Am. J. Enol. Vitic. 62, 152−168. https://doi.org/10.5344/ajev.2010.10024.

Esparza, I., Martínez-Inda, B., Cimminelli, M.J., Jimeno-Mendoza, M.C., Moler, J.A., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., 2020. Reducing SO2 Doses in Red Wines by Using Grape Stem Extracts as Antioxidants. Biomolecules 10 (10), 1369. https://doi.org/10.3390/biom10101369.

Gil-Muñoz, R.R., Vila-López, J.I., Martínez-Cutillas, A. Effects of cluster thinning on anthocyanin extractability and chromatic parameters of Syrah and Tempranillo grapes and wines. J. Int. Sci. Vigne Vine 2009, 43, 45–53. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2009.43.1.786.

Goode, J., Harrop, S., 2011. Authentic Wine: Toward Natural and Sustainable Winemaking. The Regents of the University of California: Berkeley, CA, USA.

Hopfer, H., Heymann, H., 2014. Judging wine quality: Do we need experts, consumers or trained panelists? Food Qual. Prefer. 32, 221–233. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.10.004.

Issa-Issa, H., Noguera-Artiaga, L., Sendra, E., Pérez-López, A.J., Burló, F., Carbonell-Barrachina, Á.A., López-Lluch, D., 2019. Volatile composition, sensory profile, and consumers' acceptance of Fondillón. J. Food Qual. 5981762. https://doi.org/10.1155/2019/5981762.

Mora, M., Dupas de Matos, A., Vázquez-Araújo, L., Puente, V., Hernando, J., Chaya. C., 2021. Exploring young consumers' attitudes and emotions to sensory and physicochemical properties of different red wines. Food Research International 143, 110303. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110303.

OIV. (2021). Compendium of international methods of wine and must analysis. Paris: International Organisation of Vine and Wine, Vol. 1.

Petrie, P.R., Clingeleffer, P.R., 2006. Crop thinning (hand versus mechanical), grape maturity and anthocyanin concentration: outcomes from irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) in a warm climate. Aust. J. Grape Wine Res. 12, 21–29. https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00040.x.

Petronilho, S., Lopez, R., Ferreira, V., Coimbra, M.A., Rocha, S.M., 2020. Revealing the Usefulness of Aroma Networks to Explain Wine Aroma Properties: A Case Study of Portuguese Wines. Molecules 25, 272. https://doi.org/10.3390/molecules25020272.

Rasines-Perea, Z., Prieto-Perea, N., Romera-Fernández, M., Berrueta, L.A., Gallo, B., 2015. Fast determination of anthocyanins in red grape musts by Fourier transform mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression. Eur. Food Research Technol. 240, 897-908. https://doi.org/10.1007/s00217-014-2394-6.

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2002. Tratado de Enología: Volumen 2. Química del Vino. Estabilización y Tratamientos, Editorial Hemisferio Sur: Buenos Aires, Argentina.

Roberts, R. W., Reynolds, A. G., De Savigny, C., 2007. Composition and wine sensory attributes of Chardonnay Musqué from different viticultural treatments. Int. J. Fruit Sci. 7, 57−83. https://doi.org/10.1300/J492v07n02_06.

Tardaguila, J., Petrie, P.R., Poni, S., Diago, M.P., De Toda, F.M., 2008. Effects of mechanical thinning on yield and fruit composition of Tempranillo and Grenache grapes trained to a vertical shoot-positioned canopy. Am. J. Enol. Vitic. 59, 412–417

Vally, H., Misso, N., Madan, V., 2009. Clinical effects of sulphite additives. Clin. Exp. Allergy 39(11), 1643–1651. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x.

Vaquero-Fernández, L., Fernández-Zurbano, P., Sanz-Asensio, J., Lopez-Alonso, M., Martínez-Soria, M.T., 2009. Treatment of grapevines with prohexadione calcium as a growth regulator. The influence on production, winemaking and sensory characteristics of wines. J. Int. Sci. Vigne Vin. 43, 149– 157. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2009.43.3.788.

Yildirim, H.K., Darici, B., 2020. Alternative methods of sulfur dioxide used in wine production. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 9, 675–687.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Influencia de las propiedades del suelo en mostos de la variedad Monastrell en la Comarca del Noroeste-Región de Murcia.

MÁ. Martínez [1], N. Martí[1], E. Martínez-Sabater[2] y C. Paredes[2]

[1] Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, Avda. de la Universidad, Edif. Torregaitán E-03202 (Alicante), España: nmarti@umn.es
[2] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3,2, 03312-Orihuela (Alicante)

Resumen

La vid es una planta perenne leñosa que se desarrolla siguiendo diferentes ciclos de crecimiento. Existen múltiples circunstancias que influyen en la producción y el cultivo de la vid, siendo la textura del suelo uno de los factores más relevantes, junto al clima y la topografía. También resultan cruciales para la nutrición del viñedo parámetros como el pH o la capacidad de intercambio catiónico (CIC). La vid es un cultivo nutricionalmente poco exigente, pero excesos o carencias de determinados elementos pueden afectar notablemente la calidad de la uva y, eventualmente, de los vinos elaborados. De este modo, nace el concepto de "*terroir*", una noción dinámica y compleja que engloba aspectos diversos del cultivo de la vid y que sirve de nexo entre enología y viticultura. Aunque se ha avanzado en el estudio de la relación suelo-vino, son muchos los aspectos sobre la expresión del *terroir* todavía por descubrir. El objetivo de este trabajo experimental fue estudiar la posible influencia que las propiedades de los suelos en una zona concreta, la Comarca del Noroeste (Región de Murcia), pudieran tener sobre la composición de los mostos de una variedad considerada autóctona: la Monastrell. Para ello, se analizaron propiedades físicas, físico-químicas y químicas de los suelos de dos parcelas de viñedo, y la composición de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos de los mostos de Monastrell mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y derivatización de los mostos empleando cloruro de dansilo seguida de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD). Los resultados obtenidos contribuyeron a la caracterización edafológica de la Comarca del Noroeste y probaron la existencia de cierta correlación entre la composición de suelos y mostos.

Palabras clave: caracterización edafológica, Cehegín, *Vitis vinifera* L., HPLC, HPLC-FLD

Influence of soil properties on the composition of Monastrell musts in the Northwest Region-Región de Murcia.

Abstract

Grapevine is a woody perennial plant that develops following different growing cycles. Multiple circumstances influence grapevine production and cultivation. Soil texture is one of the most relevant factors, along with climate and topography. However, pH values or cation exchange capacity (CEC) are also crucial for vineyard nutritional estate. Grapevine may be a nutritionally undemanding crop, but inadequate amount of certain elements can significantly affect grape composition and, eventually, the quality of wine. Thus, the concept of "*terroir*" was born, being a dynamic and complex idea that includes various aspects of vine growing. This intriguing and fascinating side of the science of grapevines serves as a link between Oenology and Viticulture. Although much progress has been made in the study of the soil-wine connection, further knowledge of *terroir* expression is yet to be discovered. The aim of this experimental study was to evaluate the influence that soil properties in a specific area known as the Northwest Region (Región de Murcia) could have on the composition of Monastrell musts, a grape variety thought to be native there. Some physical and chemical soil properties from two vineyard plots were analyzed, as well as the amount of sugars, organic acids and amino acids of Monastrell musts which were evaluated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and selective derivatization with dansyl chloride followed by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). The results we report here contributed to the edaphological characterization of the Northwest Region and displayed some interrelated aspects between soil properties and musts composition.

Keywords: edaphological characterization, Cehegín, *Vitis vinifera* L., HPLC, HPLC-FLD

Introducción y/o Justificación

Según van Leeuwen, Roby y de Rességuier (2018, citado por Yuste, 2019), entre los aspectos del suelo que podrían resultar útiles y de interés para el entendimiento de su efecto sobre la vid, el vino, y el *terroir*, encontramos "el efecto de la temperatura del suelo, el suministro de agua del suelo y la aportación mineral del suelo en el desarrollo, la fenología y la dinámica de la maduración de la uva, a través de variables que pueden ser cuantificadas". Es decir, se puede llegar a conocer la relación entre la calidad de un vino y la expresión de su *terroir* a través del estudio y comprensión de algunos factores y características del suelo que puedan ser evaluadas cuantitativamente. Según White (2020), aún hoy en día existe una descomunal falta de información acerca de estas cuestiones para casos muy concretos de variedades de uva cultivadas en lugares específicos.

En el presente trabajo, se propuso como objetivo principal el estudio de la relación entre las propiedades del suelo de dos parcelas de viñedo ubicadas en el municipio de Cehegín, en la Comarca del Noroeste (Región de Murcia), y las características en los mostos extraídos a partir de la uva vendimiada en dichas viñas. Para ello, se realizaron la caracterización edafológica de los suelos seleccionados atendiendo a sus particularidades físicas, físico-químicas y químicas, así como el análisis de los mostos obtenidos tras la vendimia de la uva de las parcelas estudiadas y su posterior procesado.

Material y Métodos

Muestreo de suelos y descripción de las parcelas.

Las muestras de suelos corresponden a dos parcelas localizadas en los parajes Valle del Aceniche (Parcela 1) y Venta del Pino (Parcela 2), respectivamente, situados en el término municipal de Cehegín, en la Comarca del Noroeste (Región de Murcia). Los datos descriptivos de ambas parcelas se recogen a continuación en la Tabla 1.

La variedad de uva cultivada es la variedad tinta Monastrell, portainjerto 161-49 C, en vaso, con una media de 45 años de edad. El marco de plantación en la Parcela 1 es de 2,5 x 2,5 metros, orientación Norte-Sur; en la Parcela 2 encontramos un marco inusual de 2,5 x 5 metros, orientación Este-Oeste. Ambas parcelas se cultivan en secano y se realizan los trabajos propios asociados al cuidado del viñedo de forma manual, no mecanizada, con el objetivo de lograr obtener uva de la máxima calidad posible.

Tabla 1. Descripción de las parcelas muestreadas.

Ubicación	Coordenadas UTM del centroide		Municipio	Polígono	Parcela	Superficie (m^2)	Altitud (msnm)	Pendiente (%)
Valle del Aceniche	613.152,11	4.205.069,25	Cehegín	72	2	2.736,10	850-900	8,90
Venta del Pino	610.503,92	4.206.162,81	Cehegín	68	164	2.831,90	800-850	7,57

Para el muestreo del suelo, cada parcela se dividió en diferentes zonas, atendiendo a la calidad organoléptica de la uva. La procedencia de cada muestra de suelo, tomadas a una profundidad de 30-60 cm, aparece en la Tabla 2.

Vendimia y procesado de uva.

Las fincas fueron vendimiadas entre los días 26 de septiembre y 7 de octubre de 2020, con valores de masa volúmica en torno a 1.100 g/mL, de forma manual en cajas de 10-15 kg, con selección manual en campo y bodega, encontrándose en perfectas condiciones sanitarias.

Tras la recepción de la uva, la vendimia fue despalillada y encubada en diferentes depósitos Masterllone de plástico tipo alimentario (Magusa Maquinaria Vinícola S.L.), sin adición de levaduras seleccionadas, separando en distintos lotes la uva procedente de las distintas zonas muestreadas (Tabla 2). Se tomaron 150 mL de mosto de cada lote, designando cada muestra por la "Zona" de suelo (M1-M6) y el "Lote", obteniendo un "Código" (Tabla 2).

Métodos analíticos y parámetros controlados en los suelos.

Para la preparación de las muestras de suelo, se extendieron en bandejas a temperatura ambiente para su secado durante siete días y fueron tamizadas por un tamiz de tamaño de poro de 2 mm. Los parámetros determinados en las muestras de suelo recogidas fueron los siguientes: granulometría, textura, pH, conductividad eléctrica (CE), capacidad de intercambio catiónico (CIC), materia orgánica (MO), caliza activa, sulfatos, nitrógeno total Kjeldahl (NTK) y fósforo, sodio y potasio asimilables. Todas las determinaciones de cada muestra de suelo fueron realizadas por duplicado, siguiendo lo descrito por Moreno-Caselles et al. (2003).

Métodos analíticos y parámetros controlados en los mostos.

Tabla 2. Procedencia de las muestras de mosto analizadas.

Parcela	Paraje	Zona	Zona-Suelo	Lote	Código
1	Valle del Aceniche	Arcillosa	M1	20	M1-20
			M1	21	M1-21
			M1	22	M1-22
			M1	23	M1-23
			M1	24	M1-24
		Caliza	M2	25	M2-25
			M2	26	M2-26
			M2	X	M2-X
		Viña Vieja	M3	28	M3-28
			M3	29	M3-29
			M3	30	M3-30
			M3	31	M3-31
		Tío Santiago	M4	32	M4-32
			M4	33	M4-33
			M4	Y	M4-Y
2	Venta del Pino	Kiko blanca	M5	19	M5-19
			M5	Z	M5-Z
			M5	W	M5-W
		Kiko 15	M6	15	M6-15
			M6	16	M6-16
			M6	17	M6-17

Los parámetros determinados en las muestras de mosto recogidas fueron analizados tras el encubado y antes de la fermentación alcohólica, realizando todas las determinaciones de cada muestra por duplicado. Para la determinación de azúcares (glucosa y fructosa) y ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico y ácido tartárico) las muestras fueron centrifugadas a 2.500 rpm, durante 5 minutos, y filtradas mediante filtros de celulosa Filter-lab con un tamaño de poro de 0,45 µm, para su

posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography* o HPLC) (equipo HPLC serie 1100 Agilent Technologies). Para ello, se inyectaron 10 µL de cada muestra en una columna precalentada a 30ºC (Supelcogel C610H 30 cm x 7,8 mm), protegida con una pre-columna (Supelcogel C610H 5 cm x 4,6 mm). El equipo dispone de dos detectores, un detector diodo array (210 nm), y un detector de índice de refracción. La fase móvil empleada está compuesta por ácido fosfórico 0,1%, con un flujo de 0,5 mL/min durante 35 minutos.

Estos compuestos fueron identificados y cuantificados mediante patrones externos (0-100 g/L para azúcares, 0-5 g/L para ácidos cítrico, málico y tartárico, 0-10 g/L para ácido láctico). Obtenidos los cromatogramas de patrones y muestras, se calculó la concentración de estos parámetros en las muestras de mosto y los resultados obtenidos fueron expresados en g/L.

Para la determinación de los aminoácidos presentes en las muestras se utilizó el protocolo de Tuberoso et al. (2015), mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD) realizando, en primer lugar, la derivatización de las muestras de mosto empleando cloruro de dansilo (DCL) como agente de derivatización. La identificación y cuantificación de los aminoácidos fue realizada mediante extrapolación, comparando los tiempos de retención de los aminoácidos detectados con aquellos reportados por Tuberoso et al. (2015). Los resultados se expresaron en mg/L.

Análisis estadístico.

Los resultados que se expresan en las tablas se corresponden con la media de las determinaciones por duplicado que se realizaron para cada parámetro, empleándose también estos resultados por duplicado para el análisis de varianza (ANOVA) y test Tukey Bª. Las letras “a”, “b”, “c”, “d”, etc. (de menor a mayor), distinguen grupos de datos con diferencias significativas en un 95% ($p<0,05$).

Por otro lado, el tratamiento estadístico empleado para analizar la relación entre la influencia de los parámetros de los suelos y los mostos fue el análisis de factores principales (AFP), que se aplicó en todos los parámetros estudiados a los valores medios obtenidos, utilizando el método de rotación mediante normalización Varimax. Para el estudio de los resultados se utilizó el programa informático de análisis estadístico SPSS v.27.0 (IBM Software, Armonk, New York, USA).

Resultados y Discusión

Propiedades de los suelos.

La granulometría define la composición de un suelo, originando la diversa proporción entre los elementos finos (arena, limo, arcilla) los diferentes tipos de suelo y siendo responsables directos de la “fertilidad física” de estos (Hidalgo Fernández-Cano e Hidalgo Togores, 2019). Los resultados para el contenido de arena, limo y arcilla mostraron que existían diferencias estadísticamente muy significativas entre las distintas muestras de suelo (Tabla 3). Además, en estos suelos hubo un predominio de arcilla frente a las otras fracciones del suelo, observándose por ello, texturas arcillosa y franco-arcillosa. Estos suelos arcillosos se caracterizan por ser fuertes, adhesivos y plásticos, muy fáciles de apelmazar y con gran capacidad de retención de agua y de elementos fertilizantes; los suelos francos son más equilibrados e intermedios, con buena textura y fertilidad (Hidalgo Fernández-Cano e Hidalgo Togores, 2019).

Tabla 3. Porcentajes de arena, limo y arcilla y clase textural de los suelos estudiados

Parámetro	M1	M2	M3	M4	M5	M6	ANOVA
Arena (%)	29 c	14 a	23 b	38 e	33 d	40 e	***
Limo (%)	26 b	39 d	31 c	22 ab	22 ab	20 a	***
Arcilla (%)	45 b	47 b	46 b	40 a	44 b	40 a	***
Textura	Arcillosa	Arcillosa	Arcillosa	Franco-arcillosa	Arcillosa	Franco-arcillosa	-

Los valores promedios en cada fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05) (test Tukey-b). Nivel de probabilidad del test F-ANOVA: ***: p<0,001.

Los suelos estudiados presentaron valores de pH superiores a 8,50 e inferiores a 9,00 (Tabla 4), siendo clasificados como suelos ligeramente alcalinos (Porta, López-Acevedo y Roquero, 2003). Estos suelos básicos suelen ser pobres en materia orgánica, aunque esto no supondría problema para la vid, siempre que se eviten carencias (Reynier, 2013). El principal responsable de la alcalinidad de estos suelos podrían ser los carbonatos (Maltman, 2018). Los valores de conductividad eléctrica (CE) para los suelos analizados se encontraron por debajo de 0,15 dS/m (Tabla 4), siendo todos ellos clasificados como no salinos al encontrarse por debajo de 0,35 dS/m (Cros, 1983), y aptos para el cultivo de la vid al ser dichos valores inferiores a 1,9-2,0 dS/m (Hidalgo Fernández-Cano e Hidalgo Togores, 2019). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) mide la capacidad de un suelo para retener y suministrar los nutrientes minerales para las plantas (Dlott, 2012). Los valores para los suelos analizados se encontraron entre 11-20 cmol/kg suelo (Tabla 4), siendo clasificada su CIC como normal. Sólo el suelo M3 presentó una CIC mayor, igual a 26 cmol/kg suelo, un valor alto según la clasificación (Saña, Moré y Cohí, 1996). Se observa una relación positiva entre la materia orgánica y la CIC (Ruiz Dager, Elizalde y Ríos Cabrera, 2017), destacando que el suelo con mayor CIC, el M3, es también el de mayor contenido en materia orgánica, como se comentará posteriormente.

En los suelos vitícolas el contenido en materia orgánica suele encontrarse en cantidades que oscilan entre 1-2% (Reynier, 2013). Los valores de materia orgánica (MO) que fueron encontrados en los suelos estudiados fueron inferiores al 1,5% para M1, M2, M4 y M6, apenas alcanzando el 0,45% para el M2, muy por debajo de lo considerado deseable para un suelo vitícola (Reynier, 2013). Estos suelos son clasificados como muy pobres en MO. El suelo M5 presentó un contenido en MO algo superior, por encima del 1,5%; el suelo con mayor cantidad de MO fue el M3, superando el 2,5% (Yáñez, 1989) (Tabla 4).

Tabla 4. Media del valor de las principales propiedades del suelo para cada muestra suelo (M1-M6).

Parámetro	M1	M2	M3	M4	M5	M6	ANOVA
pH	8,60 b	8,88 d	8,51 a	8,68 c	8,69 c	8,73 c	***
CE (dS/m)	0,15 a	0,14 a	0,14 a	0,13 a	0,14 a	0,14 a	NS
CIC (cmol/kg suelo)	17,3 b	12,6 a	26,0 c	15,9 b	16,4 b	18,7 b	***
MO (%)	1,02 b	0,42 a	2,61 d	0,91 b	1,70 c	1,13 b	***
Caliza activa (%)	17,6 b	25,2 c	4,9 a	12,1 b	25,5 c	12,8 b	***
Sulfatos (g/kg)	0,16 ab	0,17 ab	0,07 a	0,13 ab	0,28 c	0,22 bc	**
NTK (mg/kg)	767 bc	405 a	1416 d	701 b	908 c	793 bc	***
P asimilable (mg/kg)	18 d	4 a	11 c	9 bc	11 c	7 b	***
Na asimilable (mg/kg)	164 a	360 b	364 b	416 c	545 d	443 c	***
K asimilable (mg/kg)	318 bc	116 a	759 d	377 c	120 a	277 b	***

Los valores promedios en cada fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05) (test Tukey-b). Nivel de probabilidad del test F-ANOVA: *** y **: p<0,001 y p<0,01, respectivamente. NS: No significativo.

La fuente principal de calcio en los suelos podemos encontrarla en forma de carbonato cálcico (Andrades y Martínez, 2014). El contenido de caliza activa fue superior al 10%, en la mayoría de los

casos (Tabla 4); cuando el porcentaje es superior al 9%, se clasifica como un contenido alto (Andrades y Martínez, 2014). Los suelos con mayor porcentaje de caliza activa fueron el M2 y el M5, mientras que el de menor contenido fue el M3.

La concentración de yesos (sulfato de calcio, $CaSO_4$) en los suelos analizados osciló entre 0,07-0,28 g/kg (Tabla 4). Por otro lado, el nitrógeno total Kjeldahl (NTK) es el elemento con mayor influencia sobre el desarrollo y crecimiento de la vid (Hidalgo Fernández-Cano e Hidalgo Togores, 2019). El contenido en NTK fue mayoritariamente inferior a 1000 mg/kg, siendo clasificado como bajo (M1, M4, M5 y M6). El M3 mostró un contenido normal, y el suelo M2 tuvo un contenido muy bajo (Cobertera, 1993) (Tabla 4). Estos niveles de nitrógeno favorecen la formación de polifenoles en las uvas, especialmente antocianos (Hidalgo Fernández-Cano e Hidalgo Togores 2019).

El fósforo es un elemento que suele ser poco móvil en el suelo, donde se encuentra presente de varias formas, más o menos asimilables por las raíces (Reynier, 2013). Todos los suelos fueron clasificados como suelos con un contenido en fósforo asimilable muy bajo (inferior a 20 mg/kg) (Yáñez, 1989) (Tabla 4). Según Saña, Moré y Cohí (1996), el fósforo tiende a encontrarse de forma insoluble formando fosfatos cálcicos cristalizados; esta podría ser una posible explicación a la baja cantidad de fósforo asimilable en el suelo M2, pues se encontraría inmovilizado a consecuencia del alto valor de pH (Tabla 4).

El sodio se encuentra relacionado con la salinidad del suelo, pudiendo tener efectos sobre la calidad del suelo y el desarrollo de las plantas (Dlott, 2012; Keller, 2015). Los valores obtenidos se encontraron en torno a 400 mg/kg (Tabla 4). Se considera que el nivel máximo de en un suelo vitícola es de 140 mg Na_2O/kg (Hidalgo Fernández-Cano e Hidalgo Togores, 2019), aunque no se conoce una clasificación específica. Si bien, dado que se trata de suelos no salinos, podríamos concluir que la cantidad de sodio asimilable no resulta perjudicial.

El potasio es un elemento extremadamente importante para el crecimiento de la vid, participando en multitud de procesos y funciones metabólicos y fisiológicos (Dlott, 2012), y su absorción acompaña al ciclo vital de la planta (Reynier, 2013). El contenido en los suelos M2 y M5 fue bajo, mientras que en M1, M3, M4 y M6 se encontró un contenido alto (Sela, 2020) (Tabla 4).

Composición de los mostos.

La concentración y características de los diversos componentes de las uvas, los mostos y los vinos dependen de factores como el grado de maduración de la fruta, la región en la que se encuentra cultivada, el clima, la variedad, las prácticas culturales, etc (Monteiro-Coelho et al., 2018).
La uva acumula glúcidos llegándose a encontrar niveles que pueden oscilar entre 150-250 g/L de mosto (Hidalgo Togores, 2018). Los mostos con mayor concentración de glucosa fueron aquellos procedentes de los suelos M5 y M6, alcanzando niveles de 137 g/L y 139 g/L, respectivamente (Tabla 5), lo cual podría indicar un mayor grado de maduración de la uva (Blanco et al., 2014); no en vano, dichos mostos procedían de la Parcela 2, de orientación Este-Oeste, que recibía mayor insolación que la Parcela 1, de orientación Norte-Sur. Así, esta mayor concentración de glucosa podría ser consecuencia de una mayor acumulación de carbohidratos por una mayor exposición solar de estas vides (Keller, 2015). La fructosa es, junto a la glucosa, uno de los principales azúcares fermentables en el mosto (Esteban Lázaro, 1995). La mayor concentración de fructosa fue alcanzada por los mostos procedentes de M6 (143 g/L) (Tabla 5). La relación glucosa-fructosa es considerada prácticamente idéntica tras la maduración, por lo que los niveles de fructosa en mosto no fueron elevados, teniendo en cuenta la concentración de azúcares en mosto en niveles de 150-250 g/L (Hidalgo Togores, 2018).

Tabla 5. Media del valor de la composición de los mostos para cada muestra mosto (M1-M6).

Parámetro	M1	M2	M3	M4	M5	M6	ANOVA
Glucosa (g/L)	125 a	124 a	122 a	115 a	137 b	139 b	***
Fructosa (g/L)	128 abc	135 bc	125 ab	118 a	138 bc	143 c	**
Ác. Tartárico (g/L)	3,38 b	2,12 a	2,20 a	2,00 a	4,09 c	3,44 b	***
Ác. Málico (g/L)	9,52 a	9,56 a	8,33 a	8,76 a	9,37 a	9,43 a	NS
Ác. Cítrico (g/L)	0,13 a	0,12 a	0,12 a	0,13 a	0,14 a	0,13 a	NS
Ác. Láctico (g/L)	2,50 ab	2,81 bc	3,24 c	2,89 bc	2,14 a	2,30 ab	***
Glicina (mg/L)	0,70 b	0,67 b	0,15 a	0,12 a	0,11 a	0,10 a	***
Prolina (mg/L)	0,80 e	0,74 d	0,62 c	0,11 a	0,18 b	0,13 ab	***

Los valores promedios en cada fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05) (test Tukey-b). Nivel de probabilidad del test F-ANOVA: *** y **:p<0,001 y p<0,01, respectivamente. NS: No significativo.

Los ácidos tartárico, málico y cítrico, presentes en las uvas, junto con otros producidos durante la fermentación alcohólica, son los responsables de la acidez de mostos y vinos (Robles Calderón, Feliciano Muñoz y Chirre Flores, 2016). La concentración de ácido tartárico tras la maduración suele estar entre 3,5-1,5 g/L (Hidalgo Togores, 2018). Los mostos analizados mostraron valores de tartárico situados entre 2-4,5 g/L (Tabla 5). Los niveles de ácido málico encontrados en mostos suelen oscilar entre 1-5 g/L mosto (Hidalgo Togores, 2018). En las muestras analizadas se observó una elevada cantidad de málico, con valores entre 8,2-9,6 g/L (Tabla 5). Factores como el clima o la variedad pueden afectar dichos niveles, sin embargo, en este caso, al no existir diferencias estadísticamente significativas en la concentración de málico, aspectos generalmente influyentes sobre la síntesis y degradación de ácido málico durante la maduración de la uva, como la exposición solar (Higginson, 2015), no parecen representar ninguna característica diferencial entre las distintas zonas de las parcelas muestreadas. Por otro lado, el contenido en ácido cítrico en mostos es menor que el de los ácidos tartárico y málico, con valores entre 0,2-0,5 g/L (Hidalgo Togores, 2018). Los mostos analizados mostraron niveles inferiores a 0,14 g/L (Tabla 5), acordes al rango esperado, aunque un poco inferiores a los valores considerados habituales en mostos.

El ácido láctico puede ser encontrado en vinos como consecuencia del proceso de fermentación maloláctica, durante el cual el ácido málico es degradado y transformado a láctico por bacterias lácticas (Hidalgo Togores, 2018). Tras analizar el contenido en ácido láctico de los mostos en estudio, se vio que existía una cierta cantidad, con valores comprendidos entre 2-3,5 g/L (Tabla 5). No debería existir presencia de este ácido en los mostos, pues la actividad de las bacterias responsables de su aparición podría originar graves alteraciones. Algunos estudios señalan que la acidez de los mostos depende en gran medida de la materia prima, pudiéndose encontrar mostos que tras el procesado de la uva presenten un mayor contenido en ácido láctico, mientras otros pueden mostrar una mayor cantidad de tartárico (Boluda Puchades, 2019). Así, esta cantidad podría ser debida a un proceso natural, sin por ello significar necesariamente una alteración indeseada de estos mostos.

La procedencia de los aminoácidos que componen uva, mostos y vino es diversa, y está determinada por factores como la variedad, el clima, las prácticas culturales o las técnicas de vinificación (principalmente el tiempo de maceración y las cepas de levaduras y bacterias lácticas). Esta composición resulta interesante por los diversos roles en los que participan e influyen dichos aminoácidos (Tuberoso et al., 2015), como su importancia en la nutrición de las levaduras durante la fermentación alcohólica o su función como precursores aromáticos de algunos alcoholes superiores, influyendo, por tanto, en la calidad sensorial de los vinos finales (Burin, Caliari y Bordignon-Luiz, 2016; Bouzas Cid, 2017). En general, los aminoácidos mayoritarios en la uva son prolina, que se

acumula después del envero, y arginina, antes del envero. A partir de estos dos aminoácidos se establece un índice que se relaciona con el nitrógeno asimilable y no asimilable por las levaduras, clasificando las variedades de uva según sean acumuladoras de prolina, como Chardonnay y Cabernet Sauvignon (bajas concentraciones de nitrógeno fácilmente asimilable), o acumuladoras de arginina, como Gewürztraminer y Pinot Noir (concentraciones altas de nitrógeno fácilmente asimilable) (Bouzas Cid, 2017). En las muestras de mosto estudiadas se encontraron concentraciones variables de aminoácidos, si bien no de forma uniforme: asparagina, citrulina, ácido aspártico, glicina, tirosina, ácido glutámico, prolina, metionina, leucina y ornitina. Destacar que glicina y prolina fueron los únicos aminoácidos presentes en todos los casos (Tabla 5).

Análisis de factores principales: relación suelo-mosto.

El análisis de factores principales (AFP) se aplicó a todos los parámetros analizados (n=21). En el modelo propuesto, el valor obtenido de KMO (Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin) fue superior a 0,5 (KMO=0,537) y el P-valor fue de 0,000 para la prueba de esfericidad de Barlett. Adicionalmente, ninguna de las variables consideradas presentó un valor de extracción <0,5. Todo esto indicó que el modelo considerado fue el adecuado. Mediante el establecimiento de 3 factores principales, el modelo fue capaz de explicar el 85,075% de la variabilidad, según la siguiente contribución de cada factor principal: Factor 1: 37,608%; Factor 2: 29,754%; y Factor 3: 17,713%. En el Factor principal 1 se agruparon las variables pH, NTK, CIC, MO, K asimilable, caliza activa, ácido málico y P asimilable. Todas estas variables se correlacionaron de forma positiva, salvo el pH, la caliza activa y el ácido málico, que se correlacionaron de forma negativa con el resto de parámetros agrupados en el Factor principal 1. En el Factor principal 2 se agruparon las variables ácido tartárico, ácido láctico, glucosa, sulfatos, ácido cítrico y fructosa. Todas las variables se correlacionaron de forma positiva, a excepción del ácido láctico que se correlacionó negativamente con los demás parámetros agrupados en el Factor principal 2. En el Factor principal 3 se encontraron asociadas las variables prolina, glicina, arcilla, Na asimilable, CE, arena y limo. Estos parámetros mostraron una correlación positiva entre sí, menos el Na asimilable y la arena, que presentaron una correlación negativa con el resto de variables.

Conclusiones

La caracterización edafológica mostró que los suelos analizados pertenecían a las clases texturales arcillosa (M1, M2, M3 y M5) y franco-arcillosa (M4 y M6), con la arcilla como componente predominante con más del 40% en todos los casos.

Los suelos resultaron ser ligeramente alcalinos (pH>8,50), no salinos y aptos para el cultivo de la vid, con valores de CIC normales, y de carácter calcáreo con altos porcentajes de carbonato cálcico total equivalente y caliza activa, materia y carbono orgánicos bajos. El contenido de yeso y fósforo asimilable resultó muy bajo, con poco NTK, mientras que sodio y potasio asimilables mostraron valores más variables entre los diferentes suelos estudiados.

En cuanto al análisis de la composición de los mostos de la variedad Monastrell se vio que el contenido en glucosa y fructosa no fue elevado, mostrando el AFP una relación positiva entre composición de azúcares y el contenido en sulfatos de los suelos. El análisis reveló un bajo contenido en ácido cítrico, alta concentración de málico que no resultó estadísticamente significativa, valores no demasiado elevados de tartárico y, sorprendentemente, presencia de láctico cuyo origen pudo ser debido a la acción de bacterias lácticas presentes de forma natural en la uva.

Se encontró presencia de asparagina, citrulina, ácido aspártico, glicina, tirosina, ácido glutámico, prolina, metionina, leucina y ornitina; si bien, en concentraciones muy variables entre los mostos procedentes de los diferentes suelos estudiados, siendo glicina y prolina los aminoácidos presentes en todos los casos.

El AFP aplicado a los parámetros mostró que la mayor correlación entre suelos y mostos pareció darse

entre la composición granulométrica determinante de la clase textural y el contenido de los aminoácidos encontrados en los mostos, existiendo una correlación positiva entre las partículas de arcilla y limo y la concentración de prolina y glicina, destacando la relación arcilla-prolina al tratarse del componente mayoritario de la textura de los suelos y el aminoácido mayormente presente en los mostos. También se halló relación directa entre el contenido en sulfatos del suelo y la cantidad de glucosa, fructosa, ácido tartárico y ácido cítrico de los mostos, siendo esta correlación negativa, en cambio, para el caso del ácido láctico.

Bibliografía

Andrades, M., Martínez, M.E., 2014. Fertilidad del suelo y parámetros que la definen, ed. Universidad de La Rioja, Logroño.

Blanco, P., Díaz, E., Mirás-Avalos, J.M., Lamas, A., Soto, E., 2014. Evaluación de la producción y características del mosto en variedades gallegas bajo cultivo ecológico y convencional en DO Rías Baixas, en: García-Escudero, E., Martín, I. (Eds.), I Jornada del Grupo de Viticultura y Enología. Comunicaciones, Actas de Horticultura, 70: SECH (Sociedad Española de Ciencias Hortícolas), Logroño, pp. 262-267.

Boluda Puchades, I., 2019. Calibración de diferentes parámetros fisicoquímicos en mosto y caramelo mediante el equipo ATR Alpha Bruker (trabajo fin de máster). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Bouzas Cid, Y., 2017. Influencia del regadío y del tipo de cubierta vegetal sobre la composición en aminoácidos de las uvas y compuestos volátiles de los vinos de diversas variedades gallegas (tesis doctoral). Universidad de Vigo, Vigo, España.

Burin, V.M., Caliari, V., Bordignon-Luiz, M.T., 2016. Nitrogen compounds in must and volatile profile of white wine: influence of clarification process before alcoholic fermentation. Food. Chem. 202, 417-425. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.096.

Cobertera, E., 1993. Edafología aplicada: suelos, producción agraria, planificación territorial e impactos ambientales, ed. Cátedra, Madrid.

Cros, S.A., 1983. Manual de suelos vegetales y aguas de riego, Servicio Agronómico.

Dlott, G.A., 2012. A chemical and morphological study of soils at the Cal Poly Vineyard (trabajo fin de grado). Universidad Politécnica Estatal de California, San Luis Obispo, Estados Unidos.

Esteban Lázaro, M.A., 1995. Variaciones en la composición química de las bayas del cv. de vid Tempranillo durante la maduración, producidas por el sistema de conducción y el régimen hídrico (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Hidalgo Fernández-Cano, L., Hidalgo Togores, J., 2019. Tratado de Viticultura. Tomos I y II, ed. Mundi-Prensa, Meres.

Hidalgo Togores, J., 2018. Tratado de Enología. Tomo I, ed. Mundi-Prensa, Meres.

Higginson, E.G., 2015. The genetic basis of acid composition in developing berries of the cultivated grapevine *Vitis vinifera* (tesis doctoral). Universidad de Adelaida, Adelaida, Australia.

Keller, M., 2015. The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology. https://doi.org/10.1016/C2013-0-06797-7.

Maltman, A., 2018. Vineyards, rocks, and soils: the wine lover´s guide to Geology, ed. Oxford University Press Inc, Nueva York.

Monteiro-Coelho, E., da Silva Padilha, C.V., Aquino Miskinis, G., Gomes Barroso de Sá, A., Pereira, G.E., Cavalcanti de Azevêdo, L., dos Santos Lima, M., 2018. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: method validation and characterization of products from Northeast Brazil. J. Food Compos. Anal. 66, 160-167. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017.

Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M.D., Moral Herrero, R., Pérez Espinosa, A., Paredes Gil, C., 2003. Manual de técnicas de laboratorio para análisis de aguas, suelos, residuos orgánicos y plantas, ed. Universidad Miguel Hernández, Elche.

Porta, J., López-Acevedo, M., Roquero, C., 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente, ed. Mundi-Prensa, Madrid.

Reynier, A., 2013. Manual de viticultura, ed. Omega, Barcelona.

Robles Calderón, R., Feliciano Muñoz, O., Chirre Flores, J.H., 2016. Estudio del consumo de azúcares reductores durante la fermentación alcohólica del mosto de uva Italia para la obtención de vino blanco. Ind. Data (En línea). 19(2), 104-110. http://dx.doi.org/10.15381/idata.v19i2.12842.

Ruiz Dager, M., Elizalde, G., Ríos Cabrera, M.M., 2017. Composición de la materia orgánica, pH, intercambio catiónico y textura de cinco suelos ubicados entre 670 y 1600 msnm en la cuenca del río Maracay, Venezuela. Rev. Fac. Agron. (Maracay). 34(2), 130-157.

Saña, J., Moré, J.C., Cohí, A., 1996. La gestión de la fertilidad de los suelos, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

Sela, G., 2020. Guía de interpretación de análisis de suelos. https://www.smart-fertilizer.com/es/articles/soil-test-interpretation/ (accessed 17 Julio 2021).

Tuberoso, C.I.G., Congiu, F., Serreli, G., Mameli, S., 2015. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. Food. Chem. 175, 29-35. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.120.

Van Leeuwen, C., Roby, J.P., de Rességuier, L., 2018. Soil-related terroir factors: a review. OENO One. 52(2). https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.2.2208

White, R.E., 2020. The value of soil knowledge in understanding wine terroir. Front. Environ. Sci. 8(12). https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00012.

Yáñez, J., 1989. Análisis de suelos y su interpretación. Horticultura. 49, 75-89.

Yuste, J., 2019. Efecto enmascarante del suelo y posibilidades de manejo del viñedo para la calidad de la uva, en: Álvarez, P., (Presidencia). Simposio llevado a cabo en el XIV Encuentro técnico de la Fundación para la Cultura del Vino, Madrid, pp. 9-32.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Efecto del tratamiento de limoneros con melatonina sobre la producción y calidad del fruto

F. Badiche [1], M. Serrano [2], J.M. Valverde [1], A. Carrión-Antolí [1], D. Martínez-Romero [1], D. Valero [1], S. Castillo [1]

[1] Dept. Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel, km 3,2. 03312, Orihuela, Alicante. fbadiche@umh.es
[2] Dept. Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel, km 3,2. 03312, Orihuela, Alicante.

Resumen

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) se ha descrito recientemente como un compuesto natural que regula muchos procesos del desarrollo vegetal, aumenta la tolerancia a los estreses abióticos y bióticos y retrasa la maduración en diferentes especies de frutos, cuando se aplica como tratamiento post-recolección. Sin embargo, el efecto de los tratamientos pre-recolección está menos estudiado. Por tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de los tratamientos con melatonina, a concentraciones 0,1, 0,3 y 0,5 mM, durante el desarrollo en el árbol de limones (*Citrus lemon* L.) 'Fino' sobre el rendimiento del cultivo y la calidad del fruto en el momento de la recolección y durante su conservación. Los resultados mostraron que la producción total no se vio afectada por los tratamientos. Además, algunos parámetros de calidad de los frutos, como firmeza y contenido en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, como fenoles, fueron mayores en los frutos de los árboles tratados con melatonina que en los frutos de los árboles control en el momento de la recolección. Finalmente, también se encontró un efecto significativo de los tratamientos con melatonina retrasando el avance de la senescencia y deterioro de la calidad de los limones durante la conservación a 10 °C. Por tanto, se puede concluir que los tratamientos con melatonina durante la fase de crecimiento rápido del limón en el árbol conducen a un incremento de la calidad del fruto en la recolección y a su mantenimiento durante la conservación, especialmente en cuanto a su contenido en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y beneficios para la salud.

Palabras clave: *Citrus lemon*, firmeza, color, antioxidantes, fenoles, calidad

Effect of melatonin treatment of lemon trees on fruit yield and quality

Abstract

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) has recently been described as a natural compound that regulates many processes of plant development, such as reducing senescence, increasing tolerance to abiotic and biotic stresses and delaying ripening in different fruit species, when applied as a post-harvest treatment. However, the effect of pre-harvest treatments is less studied. Therefore, in this work, the effect of melatonin treatments, at 0.1, 0.3 and 0.5 mM concentrations, during lemon development on tree (Citrus lemon L.) 'Fino' on crop yield and fruit quality at harvest and during storage was evaluated. The results showed that the total yield was not affected by the non-commercial treatments. In addition, some fruit quality parameters, such as firmness and content of bioactive compounds with antioxidant properties, such as phenols, were higher in fruit from melatonin-treated trees than in fruit from control trees at the time of harvest. Finally, a significant effect of melatonin treatments was also found in delaying the progression of senescence and quality deterioration of lemons during storage at 10 °C. Therefore, it can be concluded that melatonin treatments during the rapid growth phase of lemon fruit on the tree lead to an increase in fruit quality at harvest and its maintenance during storage, especially in terms of its content of bioactive compounds with antioxidant properties and health benefits.

Keywords: Citrus lemon, firmness, colour, antioxidants, phenolics, quality

Introducción

La producción mundial de limón ha aumentado destacablemente en la última década. La media durante el periodo 2010-2018 fue de 5.700.000 toneladas mientras que durante 2020 alcanzó la cifra de 6.467.616 toneladas, según datos del World Citrus Organization. Teniendo en cuenta estos datos, podemos confirmar que este último año se ha consolidado el crecimiento productivo del limón. Una dinámica ascendente para el limón europeo ya que en 2020 los productores de la Unión Europea recolectaron 1.871.011 toneladas. Es decir, un 28% del total mundial, de esta forma, se ha establecido como principal potencia. De manera que, casi uno de cada tres limones consumidos en el Mundo procede de los campos europeos, y de ellos España produce aproximadamente el 60% del limón en la Unión Europea, lo que le convierte en la principal zona de cultivo y una de las más relevantes a nivel mundial. Por lo tanto, hablar de limón europeo es hablar principalmente de limón español, con la Región de Murcia, la Comunidad Valenciana y Andalucía abanderando la producción. Los cultivares más extendidos son los autóctonos "Fino" y "Verna", que se cosechan en otoño-invierno y primavera-verano, respectivamente.

Por otra parte, el limón es muy apreciado por los consumidores en todo el mundo ya que se trata de un fruto rico en compuestos fenólicos (principalmente flavonoides) y otros nutrientes (vitaminas, minerales, fibra dietética, aceites esenciales y carotenoides) que tienen un potencial antioxidante y efectos beneficiosos para la salud (González-Molina et al., 2010, Klimek-Szczykutowicz et al., 2020, Oboh et al., 2015). Por lo tanto, los tratamientos centrados en el aumento de estos compuestos bioactivos son de gran interés social. Sin embargo, los frutos de limón son susceptibles de sufrir desórdenes fisiológicos, bioquímicos y patológicos que conducen a pérdidas de calidad durante el almacenamiento y el transporte, lo que provoca pérdidas masivas de ingresos comerciales y afecta a la competitividad española con otros países (Ma et al., 2019). Sin embargo, los consumidores demandan fruta libre de tratamientos químicos para reducir, tanto el impacto ambiental, como los efectos perjudiciales para la salud humana. Por ello, se estudia el desarrollo de diferentes tratamientos naturales alternativos.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es un compuesto natural derivado de la triptamina que desempeña importantes funciones como regulador del crecimiento vegetal, ya que tiene efectos en una amplia gama de procesos fisiológicos de las plantas, incluyendo la reducción de los daños oxidativos causados por diferentes estreses bióticos y abióticos (Shi et al., 2016; Arnao y Hernández-Ruiz, 2020). Estos efectos se han atribuido a la acción de la melatonina como molécula antioxidante natural que elimina los radicales libres (Reiter et al., 2015).

La melatonina aplicada en tratamientos poscosecha ha demostrado tener diferentes efectos. Entre otros encontramos: retrasó el deterioro fisiológico de las raíces de la yuca y redujo la acumulación de H_2O_2, al mismo tiempo que aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes, manteniendo así la homeostasis de las especies reactivas del oxígeno celular (ROS) mediante el aumento de los niveles endógenos de melatonina (Ma et al., 2016). En melocotones, la aplicación de melatonina en poscosecha a 0,1 mM redujo la pérdida de peso, la incidencia de podredumbres y la tasa de respiración y también mantuvo parámetros de calidad del fruto tales como firmeza, sólidos solubles totales y contenido de ácido ascórbico durante siete días de almacenamiento a 25-28 °C, con un aumento de las enzimas antioxidantes (Gao et al., 2018).

Sin embargo, los trabajos sobre los efectos del tratamiento con melatonina antes de la cosecha en la maduración de la fruta en los árboles son escasos, mostrando diferentes efectos dependiendo de la especie de fruta, la concentración o el tiempo de aplicación. Así, Tijero et al., (2019) la melatonina 0,1 y 0,01 mM aplicada en el momento del endurecimiento del hueso inhibió la maduración en frutos de cereza dulce, mientras que el riego de plantas de tomate con melatonina 0,1 mM aumentó la

concentración de azúcar y licopeno en los frutos, mostrando un efecto positivo en la maduración de los mismos (Liu et al., 2016). En albaricoque, el tratamiento con melatonina en pulverización foliar aumentó el rendimiento y el peso del fruto, aunque no se observó ningún efecto sobre la maduración en el árbol (Abd El-Naby et al 2019, Medina-santamarina et al., 2021). Por lo tanto, el presente experimento tuvo como objetivo evaluar los efectos del tratamiento con melatonina durante el desarrollo del limón en el árbol en el proceso de maduración del limón en el árbol, así como en la evolución de las propiedades de calidad, nutricionales y funcionales durante el almacenamiento a 10 °C, utilizando el cultivar 'Fino'.

Material y Métodos

Diseño experimental y condiciones de almacenamiento

El experimento se llevó a cabo durante el periodo de otoño-invierno de 2020-2021, en un campo comercial situado en la pedanía la Matanza en Orihuela (Alicante, España), bajo prácticas agronómicas estándar para el cultivo de limón. Se utilizaron cuatro bloques de seis limoneros 'Fino' (*Citrus lemon* L. cv. 'Fino') seleccionados al azar para cada tratamiento: melatonina (Sigma Aldrich, Madrid, España) a concentraciones de 0,1, 0,3 y 0,5 mM y el control (agua destilada). Los tratamientos se aplicaron cuatro veces a intervalos aproximados de 30 días. La última aplicación se realizó 3 días antes de la cosecha según Serna-Escolano et al. (2019). Las soluciones recién preparadas (con 0,05% de Tween 20) se rociaron por vía foliar con un pulverizador mecánico. Se etiquetaron cinco frutos alrededor del perímetro ecuatorial de cada árbol, en los que se siguió el crecimiento del fruto midiendo el diámetro con un calibre digital.

Los frutos se cosecharon en la fase de maduración comercial amarilla. Sin embargo, el proceso de maduración de los frutos de limón es heterogéneo en el árbol y, por tanto, algunos frutos alcanzan su estado de maduración comercial antes que otros. Así, se realizaron dos cosechas (primera y segunda) con 30 días de diferencia, en las que se determinó la producción total (kg árbol^{-1} y número de frutos árbol^{-1}), el peso del fruto. Inmediatamente después de la primera cosecha, los frutos (unos 180 frutos de cada tratamiento) se trasladaron al laboratorio, se clasificaron y se agruparon 150 frutos homogéneos en lotes de 10 frutos. La fruta se almacenó a 10ºC en cajas cubiertas con papel de filtro dentro de la cámara. Se tomaron 3 lotes de 10 frutos al azar para cada tratamiento y la fecha de muestreo 0, 7, 14, 21 y 28 más 2 días a 20 ºC, en los que se determinó la firmeza de la fruta, la pérdida de peso, los sólidos solubles totales (SST), la acidez total (AT), la tasa de respiración y el color, así como el contenido de fenoles totales en la piel y en el zumo.

Parámetros de fisiológicos y de calidad

La pérdida de peso se determinó pesando los frutos de limón en el día 0 y después del almacenamiento y se expresó en porcentaje (%). La firmeza se midió individualmente en cada fruto con el analizador de textura TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, Reino Unido) acoplado a una placa de acero, que aplicó una fuerza que provocó una deformación del 5% del diámetro del fruto y los resultados se expresaron en N mm^{-1}. El color externo se determinó en tres puntos equidistantes a lo largo del perímetro ecuatorial de 10 frutos de cada réplica, utilizando un colorímetro Minolta (CR-400, Minolta Camera Co., Tokio, Japón), y las coordenadas CIE Lab* y el color se expresó con el parámetro a*. A continuación, se tomaron muestras del zumo de los frutos de cada réplica y se mezclaron, en las que se midieron los siguientes parámetros: en el zumo de limón, los sólidos solubles totales (SST) se midieron con un refractómetro digital (Hanna Instruments, Rhode Island, EE.UU.) y la acidez titulable (AT) mediante la valoración de 0,5 mL de zumo con NaOH 0,1 mM hasta pH 8,1 utilizando un valorador automático (785 DMP Titrino; Metrohm, Herisau, Suiza) y los resultados (media ± ES) se expresaron en g 100 mL^{-1}.

Fenoles totales y actividad antioxidante total

Los fenoles totales de la corteza se extrajeron homogeneizando 2 g de flavedo, procedentes de una muestra de la piel de los 10 frutos de cada réplica, con 15 mL de agua: metanol (2:8, v/v) con 2,0 mM de NaF. Los extractos se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C. El contenido fenólico total se midió por duplicado en cada muestra de flavedo utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteau según Serna-Escolano et al. (2019). Para la medida de los fenoles en el zumo se utilizaron 25µL del zumo procedentes de 10 limones de cada réplica, utilizando el mismo procedimiento. Los resultados (media ± ES) se expresaron como mg de ácido gálico equivalente 100 g^{-1}.

Análisis estadísticos

Para todos los experimentos, los datos se sometieron a un análisis de la varianza utilizando el SPSS, versión 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Las fuentes de variación fueron los tratamientos para los datos mostrados en las Tablas 1-5 y los tratamientos y la fecha de muestreo para los datos mostrados en las Figuras 1-4. Se calcularon las diferencias mínimas significativas globales (procedimiento de diferencias mínimas significativas de Fisher, $p < 0,05$) y se utilizaron para detectar diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados y Discusión

Efecto del tratamiento con melatonina antes de la cosecha sobre el rendimiento de los cultivos

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que muestra los efectos de la melatonina, aplicada como tratamiento previo a la cosecha, en el rendimiento del cultivo del limón y en las propiedades de calidad de la fruta, así como en el aumento de compuestos bioactivos. En la tabla 1 podemos observar que los tratamientos con distintas concentraciones de melatonina no produjeron un aumento significativo en la producción. En cuanto al número de frutos por árbol y a su peso no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos, ni en la producción total ni en el número de frutos recolectados o en su peso en ninguna de las dos recolecciones realizadas. Por otro lado, se registró el diámetro de la fruta durante el crecimiento y la maduración de limón en el árbol y los resultados se muestran en la tabla 2, en la que se puede observar una curva de crecimiento simple desde el primer tratamiento hasta la cosecha. También observamos que el crecimiento mensual de las plantas fue mayor durante el primer mes después del primer tratamiento mientras que fue disminuyendo progresivamente y la tasa mensual de crecimiento fue similar en los meses 3 y 4 (tabla 2). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento entre los limones control y los tratados con melatonina.

Tabla 1. Efecto en la producción, número de frutos por árbol y peso medio de los frutos de los tratamientos con melatonina a concentraciones de 0,1, 0,3 y 0,5 mM en limón "Fino", en los dos periodos de recolección. Los datos son la media ± ES

			Producción (kg/árbol)	Total	Nº de frutos/árbol	Total	Peso medio frutos (g)	Total
Control		1ª Rec.	75,8 ± 5,3	271,6 ±15,5	444,8 ± 28,5	1.730,7±101,5	170,3 ± 2,9	157,2 ± 3,1
		2ª Rec.	195,8 ± 13,1		1.285,8 ± 94,9		152,9 ± 3,4	
Melatonina	0,1 mM	1ª Rec.	84,7 ± 10,9	266,4 ± 12,3	504,0 ± 63,0	1.764,3± 78,9	167,8 ± 2,0	151,1 ± 2,7
		2ª Rec.	181,7 ± 13,3		1.260,3 ± 88,9		144,3 ± 3,3	
	0,3 mM	1ª Rec.	69,1 ± 12,1	269,5 ± 17,7	403,7 ± 63,8	1.737,5±109,8	169,4 ±2,9	155,1 ± 3,4
		2ª Rec.	202,0 ± 18,3		1.346 ± 127,9		150,5 ± 3,1	
	0,5 mM	1ª Rec.	97,8 ± 13,2	288,6 ± 22,2	574,5 ± 73,5	1.828,0± 146,9	169,4 ± 2,0	158,2 ± 4,1
		2ª Rec.	190,8 ± 17,2		1.253,5± 135,8		154,0 ± 4,9	

En nuestro estudio no se han producido mejoras en la producción y el rendimiento del limón mientras que en otros casos el tratamiento con melatonina si mejoró el rendimiento del cultivo. Esto puede deberse a que se trata de especies distintas de fruta. En el estudio realizado por Abd El-Naby et al. (2019) el tratamiento con melatonina mediante pulverización foliar en albaricoques mejoró el rendimiento y el peso del fruto. En la granada, tanto el número de frutos cosechados por árbol como los kg de frutos cosechados por árbol fueron significativamente mayores en árboles tratados con melatonina 0,1 mM que en los controles (Medina-Santamarina et al., 2021). Además, las granadas tratadas con melatonina 0,1 mM sufrieron un aumento del calibre con respeto de los controles. También las uvas tratadas con melatonina antes del envero mostraron una mayor acumulación de melatonina endógena y un mayor tamaño (Meng et al., 2015). Sin embargo, en este ensayo no se encontraron diferencias significativas en el peso de los limones entre los controles y los tratados con ninguna de las concentraciones de melatonina en ninguna de las dos recolecciones (Tabla 2).

Tabla 2. Diámetro de limones "Fino" durante su desarrollo y antes de la recolección y crecimiento de los frutos mensualmente después del primer tratamiento (T1) con melatonina (0,1, 0,3 y 0,5 mM). Los datos son la media ± ES.

		Diámetro ecuatorial (mm) (fecha 2020)					**Crecimiento mensual diámetro ecuatorial (mm)**			
		07/07	07/08	09/09	08/10	13/11	T1+1	T1+2	T1+3	T1+4
Control		38,8 ± 0,5	45,7 ± 0,4	50,5 ± 0,4	54,0 ± 0,5	58,5 ± 0,5	6,9 ± 0,5	4,8 ± 0,4	3,5 ± 0,4	3,7 ± 0,5
Melatonina	0,1 mM	40,3 ± 0,5	47,3 ± 0,5	52,4 ± 0,6	56,1 ± 0,6	59,9 ± 0,6	7,0 ± 0,5	5,1 ± 0,5	3,7 ± 0,6	3,8 ± 0,6
	0,3 mM	39,8 ± 0,6	46,5 ± 0,7	51,8 ± 0,7	55,3 ± 0,8	59,1 ± 0,7	6,7 ± 0,6	5,3 ± 0,7	3,5 ± 0,7	3,8 ± 0,8
	0,5 mM	39,6 ± 0,6	46,0 ± 0,6	50,6 ± 0,6	54,2 ± 0,7	58,1 ± 0,7	6,4 ± 0,6	4,6 ± 0,6	3,6 ± 0,6	3,9 ± 0,7

Efecto del tratamiento con melatonina sobre la pérdida de peso, el color, la firmeza, y la acidez titulable en frutos de limón

Tras la recolección de los frutos, se pasó a su conservación a 10 ºC durante 4 semanas. A los 7, 14,21 y 28 días se sacaron las muestras y se mantuvieron dos días más a 20 ºC antes de ser analizadas. Durante la conservación de los frutos, se pudo comprobar que los tratamientos con melatonina (0,1, 0,3 y 0,5 mM) presentaron durante todo el periodo de conservación una pérdida de peso menor con respecto de los frutos control, siendo esta pérdida de 9,56 ± 0,47 % y significativamente más baja, aproximadamente 7 % en todos los tratados (tabla 3). Sin embargo, entre los tratamientos no apreciamos diferencias significativas en la evolución de las pérdidas de peso. La firmeza del fruto fue mayor en los limones de los árboles tratados que en los de árboles control, entre un 10% y un 20% durante todo el periodo de conservación (tabla 3). Gao et al. (2016) obtuvieron un resultado similar al demostrar que la incidencia de descomposición y la pérdida de peso se redujeron significativamente con el tratamiento con melatonina en el melocotón durante el almacenamiento y que la firmeza mejoró respecto a los controles. También se produjo el mismo efecto en fresas tratadas con melatonina poscosecha, ya que en comparación con el control, los tratamientos con melatonina 0,01 mmol L^{-1} y 1 mmol L^{-1} disminuyeron significativamente la pérdida de peso y mantuvieron mejor la firmeza de la fruta (Liu et al., 2018).

Tabla 3. Atributos de calidad (pérdidas de peso, firmeza, color y acidez total) de limones "Fino" procedentes de árboles tratados con melatonina y control durante la conservación a 10 °C +2 días a 20 °C. Los datos son la media ± ES.

	Días	Control	Melatonina		
			0,1 mM	0,3 mM	0,5 mM
Pérdidas de peso (%)	0	-	-	-	-
	7	3,9 ± 0,3 a	3,1 ± 0,1 a	3,2 ± 0,2 a	2,9 ± 0,1 a
	14	5,1 ± 0,5 a	3,8 ± 0,2 b	3,9 ± 0,2 b	3,7 ± 0,2 b
	21	7,3 ± 0,4 a	5,8 ± 0,2 b	5,7 ± 0,4 b	5,5 ± 0,3 b
	28	9,6 ± 0,5 a	6,9 ± 0,3 b	6,7 ± 0,5 b	7,0 ± 0,4 b
Firmeza (N/mm)	0	13,6 ± 0,5 b	14,9 ± 0,5 a	15,0 ± 0,4 a	14,7 ± 0,4 a
	7	8,4 ± 0,3 b	9,9 ± 0,5 a	10,1 ± 0,5 a	10,3 ± 0,4 a
	14	7,8 ± 0,2 b	8,7 ± 0,4 a	9,1 ± 0,3 a	9,6 ± 0,4 a
	21	6,6 ± 0,3 b	8,0 ± 0,5 a	8,5 ± 0,6 a	8,4 ± 0,5 a
	28	5,8 ± 0,2 b	6,5 ± 0,4 a	6,8 ± 0,5 a	7,1 ± 0,4 a
Color a*	0	-15,8 ± 0,3 a	-17,2 ± 0,2 a	-16,7 ± 0,4 a	-17,2 ± 0,4 a
	7	-13,5 ± 0,6 a	-14,1 ± 0,4 a	-14,7 ± 0,5 a	-13,4 ± 0,7 a
	14	-11,4 ± 0,4 a	-11,1 ± 0,4 a	-14,3 ± 0,4 b	-10,7 ± 0,4 a
	21	-6,6 ± 0,3 a	-6,9 ± 0,4 a	-9,1 ± 0,4 b	-6,4 ± 0,5 a
	28	-5,7 ± 0,4 a	-6,7 ± 0,4 a	-6,7 ± 0,5 b	-5,7 ± 0,3 a
Acidez total (g/100 ml)	0	6,4 ± 0,08 a	6,4 ± 0,05 a	6,1 ± 0,04 b	6,6 ± 0,05 a
	7	6,4 ± 0,07 a	6,5 ± 0,04 a	6,1 ± 0,09 b	6,3 ± 0,2 ab
	14	6,3 ± 0,1 b	6,6 ± 0,04 a	6,0 ± 0,10 c	6,5 ± 0,06 ab
	21	6,8 ± 0,07 a	6,4 ± 0,04 a	6,0 ± 0,07 c	6,4 ± 0,06 a
	28	7,1 ±0,03 a	7,2 ± 0,05 a	6,6 ± 0,07 b	7,1 ± 0,06 a

El color es uno de los factores más importantes que puede afectar a la percepción del consumidor. En este estudio los frutos fueron recolectados a mediados de noviembre, siendo el color a* negativo, de un verde más o menos intenso en todos los frutos recolectados, tanto los tratados como el control (tabla 3). Durante la conservación esta tonalidad verde fue desapareciendo y pasó de valores de – 16 a valores de -6 exceptuando el caso del tratamiento con melatonina 0,3 mM. Estos resultados muestran que durante la conservación se produjo un cambio de color menor para los frutos tratados con melatonina 0,3 mM lo que indicaría un retraso en la maduración post-recolección. En la tabla 3, observamos que la acidez total fue similar en prácticamente todos los tratamientos durante la conservación, produciéndose un ligero aumento al final del periodo de conservación. No obstante, es interesante señalar que en el momento de la recolección los niveles de acidez fueron significativamente más bajos en los limones de los árboles tratados con melatonina 0,3 mM (tabla 3).

La melatonina se ha estudiado como tratamiento para prolongar la vida útil de la fruta después de la cosecha y para mejorar la calidad de la misma. En este sentido, Liu et al. (2018) informaron que los cambios en el color y la acidez titulable de la fruta de fresa fueron significativamente retrasados después del tratamiento con melatonina de fresa. Por otro parte, Sun et al. (2015) indicaron que el tratamiento con melatonina aumentó los niveles de licopeno y aumentó los genes clave implicados en el desarrollo del color en los frutos de tomate después de la cosecha. En cuanto a la acidez, en el trabajo de Medina-Santamarina et al. (2021), las granadas tratadas con melatonina retrasaron su proceso de maduración y por tanto las pérdidas de la acidez titulable.

Efecto del tratamiento con melatonina sobre la composición en fenoles totales en frutos de limón

El limón es rico en compuestos antioxidantes con efectos beneficiosos para la salud, debido fundamentalmente a su contenido en compuestos fenólicos. Tanto en la corteza como en el zumo el contenido total de fenoles fue superior en los frutos de los árboles tratados con melatonina que en los de los árboles control (tabla 4). Los resultados muestran que la concentración fenólica fue mayor en la piel de limón que en el zumo. Los fenoles de la piel se encontraron en mayor cantidad en los tratamientos de melatonina 0,3 y 0,5 mM, mientras que en el zumo el mayor contenido en fenoles lo presento el tratamiento 0,3 mM. Además, se observó una tendencia a aumentar el contenido de fenoles en la piel durante el almacenaje, mientras que en el zumo esta tendencia fue descendente.

Tabla 4. Contenido de fenoles totales en la corteza ye en el zumo de limones "Fino" procedentes de árboles tratados con melatonina y control durante la conservación a 10 °C +2 días a 20 °C. Los datos son la media ± ES.

	Días	**Control**	**Melatonina**		
			0,1 mM	0,3 mM	0,5 mM
Fenoles totales en la piel (mg/100g)	0	229,5 ± 6,1 b	243,0 ± 7,5 b	268,5 ± 11,2 a	270,3 ± 6,8 a
	7	223,4 ± 5,3 c	245,1 ± 3,7 b	258,0 ± 5,3 a	261,4 ± 9,0 a
	14	236,6 ± 3,6 c	261,1 ± 6,6 b	284,1 ± 7,4 a	269,4 ± 4,0 a
	21	245,5 ± 7,0 b	269,6 ± 18,4	281,1 ± 5,8 a	268,0 ± 8,8 ab
	28	232,4 ± 2,8 c	270,7 ± 14,1 b	278,7 ± 7,8 b	295,2 ± 5,8 a
Fenoles totales en zumo (mg/100g)	0	45,6 ± 2,1 b	51,5 ± 1,5 a	51,4 ± 4,1 a	50,4 ± 3,0 a
	7	37,7 ± 2,1 b	47,6 ± 1,3 a	47,8 ± 2,5 a	47,1 ± 3,1 a
	14	36,7 ± 1,5 c	42,8 ± 3,3 b	49,1 ± 3,4 a	50,0 ± 3,2 a
	21	34,7 ± 1,9 c	40,6 ± 2 b	50,7 ± 2,5 a	46,8 ± 2,3 a
	28	33,2± 2,5 b	41,4 ± 2,3 a	41,1 ± 1,9 a	45,6 ± 2,6 a

Muchos estudios han relacionado la presencia de melatonina con el aumento de compuestos fenólicos y compuestos con capacidad antioxidante. Así, por ejemplo, el lichi tratado con melatonina mejoró la concentración de fenoles totales y antocianinas, manteniendo la calidad nutricional de los frutos (Zhang et al., 2018; Aghdam & Fard 2017). En el tomate el tratamiento con melatonina aumento la cantidad de algunos compuestos con actividad antioxidante (Liu et al., 2016) como en el caso de los compuestos fenólicos en el limón. Ma et al. (2016) mostraron que el tratamiento con melatonina en yuca aumentaba la actividad de las enzimas antioxidantes. Recientemente también ha reportado de un aumento similar en la concentración de compuestos fenólicos después de la aplicación de melatonina en uvas de mesa (Wang et al., 2020)

Conclusiones

Este es el primer estudio en el que se ha aplicado tratamientos con melatonina a concentraciones de 0,1, 0,3 y 0,5 mM previos a la cosecha en frutos de limón "Fino". No se produjeron cambios ni aumentos significativos en la producción del cultivo, pero sí observamos un efecto significativo en el aumento de algunos parámetros de la calidad del fruto de limón en la cosecha y durante el almacenamiento. Durante el almacenamiento postcosecha, se encontró una reducción de las pérdidas de peso y de firmeza en los frutos tratados con melatonina. La acidez disminuyó con el tratamiento con 0.3 mM. Además, la concentración de fenoles totales también fue mayor tras el tratamiento con melatonina. En general, la melatonina podría ser una herramienta fiable, factible y rentable para ser utilizada como bioestimulante vegetal con el fin de aumentar el rendimiento y los parámetros de calidad del fruto en la cosecha y mantenerlos durante el almacenamiento, siendo la concentración 0,3 mM la más recomendable. En el futuro, debería investigarse el posible papel de la melatonina en los compuestos bioactivos responsables de sus efectos beneficiosos para la salud.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España a través de Proyecto RTI2018-09966-B-100 y la Comisión Europea con fondos FEDER.

Bibliografía

Abd El-Naby, S.K.M.A.; Mohamed, A.A.A.; El-Naggar, Y.I.M. **2019.** Effect of melatonin, GA3 and NAA on vegetative growth, yield and quality of 'Canino' apricot fruits. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, *18*, 167–174. https://doi.org/10.24326/asphc.2019.3.16

Aghdam, M. S., & Fard, J. R. (2017). Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (Fragaria× anannasa cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity. Food Chemistry, 221, 1650-1657. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.123

Arnao, M.B.; Hernández-Ruiz, J. 2020. Is Phytomelatonin a New Plant Hormone? Agronomy, 10(1), 95; https://doi.org/10.3390/agronomy10010095

González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 327-345.

Gao, H.; Lu, Z.; Yang, Y.; Wang, D.; Cao, M.; Cao, W. 2018. Melatonin treatment reduces chilling injury in peach fruit through its regulation of membrane fatty acid contents and phenolic metabolism. Food Chemistry, 245, 659–666. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.008

Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). Citrus limon (Lemon) phenomenon—a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. Plants, 9(1), 119.

Liu, J.; Zhang, R.; Sun, Y.; Liu, Z.; Jin, W.; Sun, Y. 2016. The beneficial effects of exogenous melatonin on tomato fruit properties. *Sci. Hortic.*, *207*, 14–20. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.003

Liu, C., Zheng, H., Sheng, K., Liu, W., & Zheng, L. (2018). Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *139*, 47-55. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.016

Ma, Q.; Zhang, T.; Zhang, P.; Wang, X.Y. 2016**.** Melatonin attenuates postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *J. Pineal Res.*, *60*, 424–434. Doi:10.1111/jpi.12325

Ma, Y., Li, S., Yin, X., Xing, Y., Lin, H., Xu, Q. Chen, C. 2019. Effects of controlled atmosphere on the storage quality and aroma compounds of lemon fruits using the designed automatic control apparatus. *BioMed research international*, Vol. 2019, Article ID 6917147, 17. https://doi.org/10.1155/2019/6917147

Martínez−Esplá, A., Zapata, P. J., Valero, D., Martínez−Romero, D., Díaz−Mula, H. M., Serrano, M. 2018. Preharvest treatments with salicylates enhance nutrient and antioxidant compounds in plum at harvest and after storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,*98*(7), 2742-2750. doi: 10.1002/jsfa.8770.

Medina-Santamarina, J., Serrano, M., Lorente-Mento, J. M., García-Pastor, M. E., Zapata, P. J., Valero, D., & Guillén, F. (2021). Melatonin treatment of pomegranate trees increases crop yield and quality parameters at harvest and during storage. Agronomy, 11(5), 861. https://doi.org/10.3390/agronomy11050861

Medina-Santamarina, J., Zapata, P. J., Valverde, J. M., Valero, D., Serrano, M., & Guillén, F. (2021). Melatonin treatment of apricot trees leads to maintenance of fruit quality attributes during storage at chilling and non-chilling temperatures. Agronomy, 11(5), 917.

Meng, JF; Xu, TF; Song, CZ; Yu, Y .; Hu, F .; Zhang, L .; Zhang, ZW; Xi, ZM Tratamiento con melatonina de las uvas antes del envero para aumentar el tamaño y la sincronicidad de las bayas y modificar los componentes del aroma del vino. *Food Chem.* 2015 , *185* , 127-134.

Oboh, G., Bello, F. O., Ademosun, A. O., Akinyemi, A. J., & Adewuni, T. M. (2015). Antioxidant, hypolipidemic, and anti-angiotensin-1-converting enzyme properties of lemon (Citrus limon) and lime (Citrus aurantifolia) juices. Comparative Clinical Pathology, 24(6), 1395-1406.

Qianqian Sun, Na Zhang, Jinfang Wang, Haijun Zhang, Dianbo Li, Jin Shi, Ren Li, Sarah Weeda, Bing Zhao, Shuxin Ren, Yang-Dong Guo, Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life, *Journal of Experimental Botany*, Volume 66, Issue 3, February 2015, Pages 657–668. https://doi.org/10.1093/jxb/eru332

Reiter, R.T.; Tan, D.X.; Zhou, Z.; Coelho-Cruz, M.E.; Fuentes-Broto, L.; Galano, A. 2015. Phytomelatonin: Assisting plants to survive and thrive. Molecules, 20(4), 7396-7437; https://doi.org/10.3390/molecules20047396

Serna−Escolano, V., Valverde, J. M., García−Pastor, M. E., Valero, D., Castillo, S., Guillén, F., Serrano, M. 2019. Pre−harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(11), 5035-5043. DOI 10.1002/jsfa.9746

Shi, H.; Chen, K.; Wei, Y.; He, C. 2016. Fundamental issues of melatonin-mediated stress signaling in plants. *Front. Plant Sci.*,*7*, 1124. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01124

Tijero, V.; Muñoz, P.; Munné-Bosch, S. 2019**.** Melatonin as an inhibitor of sweet cherries ripening in orchard trees. *Plant Physiol. Biochem. 140*, 88–95. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.007

Wang, L., Luo, Z., Yang, M., Li, D., Qi, M., Xu, Y., ... & Li, L. (2020). Role of exogenous melatonin in table grapes: First evidence on contribution to the phenolics-oriented response. *Food Chemistry*, *329*, 127155. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127155

Zhang Y, Huber DJ, Hu M, Jiang G, Gao Z, Xu X, Jiang Y, Zhang Z. Delay of Postharvest Browning in Litchi Fruit by Melatonin via the Enhancing of Antioxidative Processes and Oxidation Repair. J Agric Food Chem. 2018 Jul 18;66(28):7475-7484. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01922. Epub 2018 Jul 10. PMID: 29953220. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01922

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Los tratamientos con melatonina aumentan el rendimiento del cerezo y la calidad del fruto en la recolección y durante la conservación

M. V. Arias [1], A. Carrión [2], F. Garrido [3], J. M. Lorente[3], P. J. Zapata [2], D. Valero [2], M. Serrano [3]

[1] C/Alicante N29 Bajo A3, Almoradí, Alicante. maria.arias02@alu.umh.es.
[2] Dept. Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel, km 3,2. 03312, Orihuela, Alicante.
[3] Dept. Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel, km 3,2. 03312, Orihuela, Alicante.

Resumen

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) se ha descrito recientemente como un compuesto natural que regula muchos procesos del desarrollo vegetal, como reducir senescencia, aumentar la tolerancia a los estreses abióticos y bióticos y retrasar la maduración en diferentes especies de frutos, cuando se aplica como tratamiento post-cosecha. Sin embargo, el efecto de los tratamientos pre-cosecha está menos estudiado. Se evaluaron tratamientos con melatonina, sobre el rendimiento del cultivo y la calidad del fruto en el momento de la recolección y durante su conservación. Los resultados mostraron que la producción total aumentó en los árboles tratados y se redujo el destrío. También, parámetros de calidad fueron mayores en las cerezas de los árboles tratados en el momento de la recolección. Durante la conservación, las pérdidas de peso, de acidez y de firmeza, así como el deterioro de los pedúnculos evolucionaron más lentamente en las cerezas de los árboles tratados con melatonina. Finalmente, el contenido en compuestos bioactivos, como fenoles y antocianinas, fue superior en las cerezas de los árboles tratados, tanto en la recolección como durante todo el tiempo de conservación.

Palabras clave: *Prunus avium*, color, melatonina, antocianinas, fenoles.

Melatonin treatments in cherry trees increase crop yield and fruit quality at harvest and during storage

Abstract

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) has recently been described as a natural compound that regulates many processes of plant development, such as reducing senescence, increasing tolerance to abiotic and biotic stresses, and delaying maturation in different species of fruits, when applied as a post-harvest treatment. However, the effect of pre-harvest treatments is less studied. The effects of melatonin treatments on the crop yield and fruit quality parameters at the time of harvest and during its storage were evaluated in the present experiment. Results showed that crop yield increased, and unmarketable fruit were reduced in treated trees with respect to controls. In addition, quality parameters were higher in sweet cherries of treated trees at harvest than in those from control trees. During storage, fruit weight, acidity, and firmness losses, as well as peduncle deterioration evolved more slowly in sweet cherries from melatonin treated trees than in controls. Finally, the content of bioactive compounds, such as phenols and anthocyanins, was higher in the sweet cherries from treated trees, both at harvest and during the entire storage period.

Keywords: *Prunus avium*, color, melatonin, anthocyanins, phenols.

Introducción y Justificación

Las cerezas son muy apreciadas por los consumidores debido a sus características sensoriales. Los parámetros más valorados son el color, el tamaño del fruto, la firmeza y el dulzor (Kappel et al., 1996; Serrano et al., 2005; 2009). Para que las cerezas sean aceptadas y de calidad deben estar enteras, con aspecto fresco, pedúnculo verde e hidratado, sanas y libres de podredumbre o alteraciones, además, deben soportar la manipulación y el transporte hasta su destino final.

Por otra parte, la cereza es un fruto de hueso no climatérico, en el que la maduración no está regulada por el etileno y además la respiración disminuye de forma gradual, por tanto, se debe asegurar que haya alcanzado una maduración óptima antes de su cosecha, ya que, de lo contrario, los azúcares no alcanzarán los niveles adecuados para que alcance una calidad óptima para el consumo (Valero y Serrano, 2010).

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una molécula del tipo indolamina que se encuentra en animales, hongos, bacterias y plantas. A partir de 1995, fecha en la que se descubrió la presencia de melatonina en plantas superiores por Dubbels et al. (1995) y Hattori et al. (1995), se han descrito diferentes funciones fisiológicas en las plantas como defensa ante el estrés oxidativo, regulación del ciclo circadiano y foto-respuesta, senescencia de las hojas y crecimiento de raíces (Tan et al., 2012). Además de influir en distintas propiedades reguladoras del metabolismo, como por ejemplo los mecanismos de tolerancia al estrés biótico y abiótico, también actúa como eliminador de radicales libres, minimizando el estrés oxidativo. Varios grupos de investigación han descrito que la aplicación de melatonina exógena participa en la mejora del desarrollo, producción, senescencia, maduración y calidad post-recolección de los frutos (Arnao y Hernández-Ruiz, 2015). En cereza, sólo hay un trabajo previo en el que se ha comprobado que la aplicación de melatonina a cerezos tuvo un efecto inhibitorio de la maduración de los frutos en el árbol (Tijero et al., 2019).

En este trabajo se plantea como objetivo analizar el efecto del tratamiento con melatonina durante el desarrollo de cerezas de la variedad *Sweet Heart* en el árbol sobre la producción total de los cerezos y sobre la calidad de los frutos, tanto en el momento de la recolección como durante su conservación a 2 °C. Se emplearán tres concentraciones de melatonina, 0,1, 0,3 y 0,5 mM, de acuerdo con las dosis que se han utilizado en los trabajos previos publicados.

Material y Métodos

Para la realización del experimento se emplearon cerezas (*Prunus avium* L.) de la variedad *Sweet Heart*. Los tratamientos se aplicaron mediante pulverización foliar con soluciones de melatonina y se realizaron en tres aplicaciones según Díaz-Mula et al. (2009).

Las cerezas se cosecharon en estado de maduración comercial según Serrano et al. (2009) y se determinó la producción en kg por árbol, el peso medio de las cerezas y el porcentaje de frutos de destrío en una muestra al azar de 100 cerezas de cada árbol. Tres kg de cada tratamiento y repetición se transportaron al laboratorio donde se seleccionaron 100 frutos sin defectos visuales y de tamaño y color homogéneos de cada tratamiento y repetición para agruparlos en 5 lotes distintos de 20 frutos. Estos lotes se pesaron y se almacenaron en una cámara frigorífica en una atmósfera normal a 2 °C y HR del 85%. Después de 0, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento en frío se sacó al azar un lote de cada repetición y tratamiento y en ellos se determinaron las pérdidas de peso, la firmeza, el color, la calidad del pedúnculo, los sólidos solubles totales (SST) y la acidez titulable (AT) y el contenido en antocianinas y fenoles totales.

Para determinar el peso de los frutos se empleó una balanza Mettler modelo PC-4400 con dos cifras decimales de precisión ± 0,01. Los lotes se pesaron el día de la recolección y después de cada período de conservación y las pérdidas de peso se expresaron en porcentaje con respecto al peso del día 0. Los datos son la media ± SE (n=3).

El color se determinó en las 20 cerezas de cada repetición y tratamiento usando un colorímetro CR-200 (Konica Minolta, Inc., Tokio, Japón), y empleando las coordenadas CIE Lab. Los resultados se expresaron como el parámetro de color a* y son la media ± SE (n=60).

La firmeza se midió individualmente en cada cereza, usando una placa de acero plana montada en un analizador de textura TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, Reino Unido) conectado a un ordenador y se aplicó una fuerza capaz de lograr la deformación del 5% del diámetro. Los resultados finales se expresaron como la relación fuerza-deformación ($N \cdot mm^{-1}$) y son la media ± SE (n=60).

Para la valoración del pardeamiento del pedúnculo se utilizó una escala hedónica de 0 a 5 en la cual se asignaron valores de 5 al pedúnculo totalmente verde, 4 cuando presentaba un 80% de su longitud verde, 3 cuando el 60% presentaba color verde, 2 cuando el verde suponía un 40% del pedúnculo, 1 cuando el verde ocupaba un 20% del pedúnculo y 0 cuando el pedúnculo estaba totalmente pardeado y deshidratado.

Después, se obtuvo una mezcla homogénea de las 20 cerezas de cada repetición. 50 g se usaron para obtener un zumo, mediante prensado y filtrado en tela de algodón, en el que se midieron los SST y la AT y otros 50 g se congelaron a -20 ºC para medir posteriormente el contenido en antocianinas y fenoles totales.

Los SST se midieron por duplicado en el zumo obtenido de cada repetición, usando un refractómetro digital Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Japón) a 20 ºC y los resultados se expresaron en g 100 g^{-1}. Los datos son la media ± SE (n=6).

Por otro lado, la TA también se determinó por duplicado usando 1 ml del zumo preparado anteriormente diluido en 25 ml de agua destilada por titulación automática (785 DMP Titrino, Metrohm AG, Herisau, Suiza) con 0,1 N NaOH hasta pH 8,1. Los resultados fueron expresados como g equivalentes de ácido málico por 100 g^{-1} de peso fresco, calculados según la ecuación 1 que se muestra a continuación. Los datos son la media ± SE (n=6).

$$\frac{g\ \acute{a}cido\ m\acute{a}lico}{100\ ml} = \frac{6{,}7 \cdot V_1 \cdot f \cdot N}{P} \qquad (1)$$

Siendo: V_1= Volumen de NaOH empleado en la valoración; N= Normalidad del NaOH; f= Factor del NaOH y P= peso de la muestra (g).

La extracción de fenoles se llevó a cabo como se describió en Serrano et al. (2009), utilizando 5 g de tejido congelado y 10 ml de agua:metanol (2:8) con NaF 2 mM, con el objetivo de inactivar la enzima polifenol oxidasa y evitar la degradación de los fenoles. La cuantificación se realizó por duplicado en cada extracto con el reactivo Folin-Ciocalteu y los resultados (media ± SE) se expresaron como mg de ácido gálico equivalente a 100 g^{-1} peso fresco (FW).

Para la extracción de antocianinas se utilizaron 2 g de tejido que se homogenizaron en 10 ml de metanol: ácido fórmico: agua (25:1:24, v/v/v). Por último, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min. La concentración total de antocianinas en el sobrenadante se midió por duplicado, leyendo la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro Helios-α de UNICAM (Cambridge, Reino Unido), y se expresó en mg de cianidín 3-glucósido equivalente (coeficiente de absorción molar de 23.900 M^{-1} cm^{-1} y peso molecular de 449,2 g mol^{-1}) por 100 g FW (media ± SE).

El diseño utilizado para la realización del experimento fue completamente al azar, siendo 3 el número de repeticiones para cada uno de los tratamientos. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, $p<0.05$, utilizando el paquete de software SPPSS v. 11.0 para Windows (SPSS, 2001).

Resultados

La producción total fue de 35,17 ± 0,96 kg árbol^{-1} en los árboles control, y significativamente mayor (p<0,05) en los tratados con melatonina, siendo el efecto más elevado con la concentración 0,3 mM, en los que se recolectaron 40,17 ± 1,37 kg árbol^{-1} (Figura 1). Un efecto similar de los tratamientos con melatonina se encontró en la producción de frutos comerciales, ya que el porcentaje de destrío se redujo como consecuencia de los tratamientos, desde ≈4% en los controles hasta menos del 1% en los tratados (Figura 1). Además, el peso de la cereza también aumentó significativamente con los tratamientos con melatonina a 0,3 y 0,5 mM, un 6 y 8%, respectivamente (p<0,05), con respecto al peso de las cerezas de los árboles control que fue de 8,40 ± 0,12 g (Figura 1). En estos parámetros, los mayores efectos se observaron con la dosis 0,3 mM.

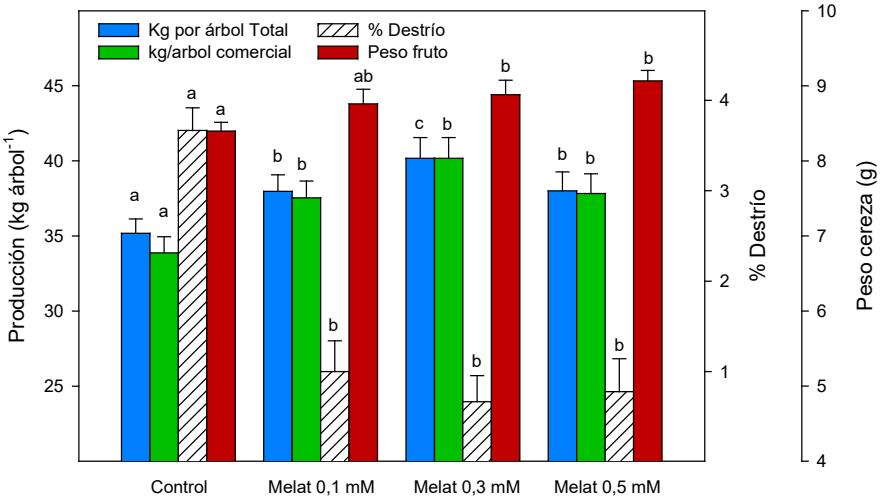


Figura 1. Producción total, producción comercial, porcentaje de destrío y peso del fruto en las cerezas 'Sweet Heart' de los árboles control y de los tratados con melatonina (Melat) a concentraciones 0,1, 0,3 y 0,5 mM. Los datos son la media ± ES de tres repeticiones de tres árboles cada una.

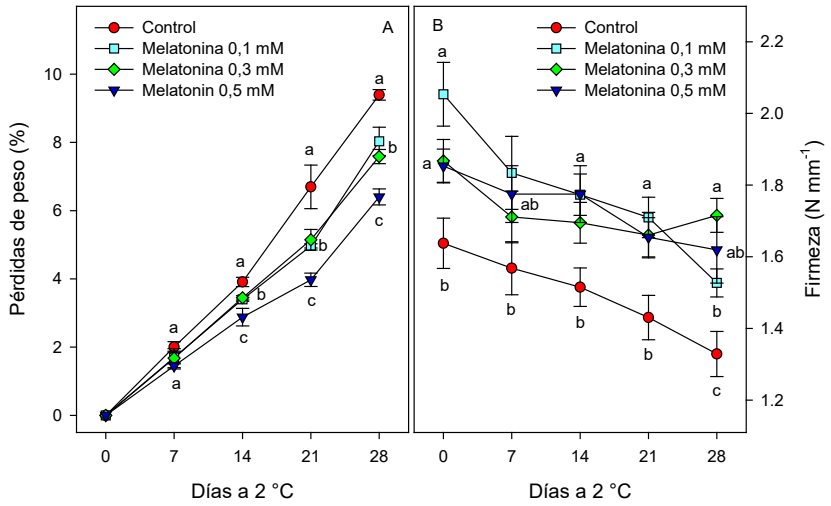


Figura 2. Pérdidas de peso (A) y valores de firmeza (B) de las cerezas de los árboles control y de los tratados con melatonina (0,1, 0,3 y 0,5 mM) durante su conservación a 2 ºC. Para el color los datos son la media ± ES de tres lotes de 20 frutos y para la firmeza son la media ± ES de las medidas realizadas individualmente en los 20 frutos de cada uno de los 3 lotes.

Las pérdidas de peso incrementaron de forma casi lineal durante la conservación de las cerezas a 2 ºC, aunque estas pérdidas de peso se vieron retrasadas en los frutos de los árboles tratados, alcanzándose valores de 9,39 ± 0,15 % en los frutos control, 7,5-8% en los tratados con melatonina a 0,1 y 0,3 mM y de 6,40 ± 0,23 % en las cerezas de los árboles tratados con melatonina a 0,5 mM a los 28 días de conservación (Figura 2A). En cuanto a la firmeza, se pudo observar un efecto significativo de los tratamientos (p<0,05) incrementando la firmeza de los frutos en el momento de la recolección (día 0). En todos los frutos la firmeza disminuyó de forma progresiva a lo largo de todo el período de conservación, pero en los frutos de los árboles tratados con melatonina se encontraron valores significativamente mayores (p<0,05) hasta el final del almacenaje, aunque sin diferencias entre las dosis aplicadas (Figura 2B).

En el momento de la recolección (día 0), las cerezas de los árboles que recibieron tratamiento presentaban un valor del parámetro a* del color entre 24,5-25, mientras que los frutos control mostraron un valor de 22,89 ± 0,49 a*, significativamente inferior (P<0,05). Las cerezas de todos los tratamientos y del control presentaron una variación ascendente del color hasta el día 14 de conservación a 2 ºC, sin embargo, a partir de entonces se observó un descenso del color a* hasta los 28 días de conservación (Figura 3A). Con respecto a la calidad del pedúnculo, la tendencia a disminuir se percibió en todos los frutos. Las cerezas de los árboles control mostraron valores significativamente menores (P<0,05) durante todo el periodo de conservación a 2 ºC. Los valores de calidad del pedúnculo fueron superiores a 2,5 en los frutos de los árboles tratados hasta el día 21 de conservación, sin diferencias entre las concentraciones de melatonina aplicadas, lo que significa que más del 50% del pedúnculo presentaba color verde. Sin embargo, en las cerezas control, este valor se alcanzó después de una semana de conservación (Figura 3B).

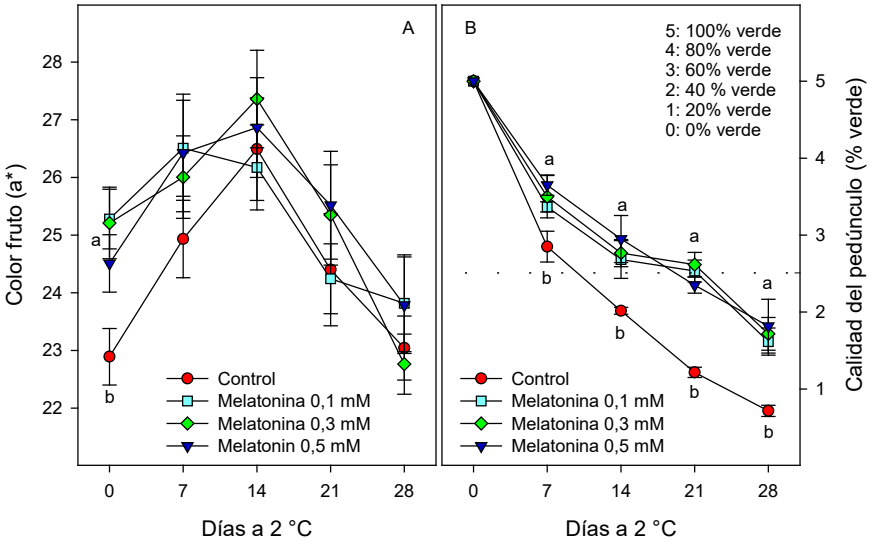


Figura 3. Color del fruto (A) y calidad del pedúnculo (B) de las cerezas de los árboles control y de los tratados con melatonina (0,1, 0,3 y 0,5 mM) durante su conservación a 2 ºC. Para el color los datos se muestran como la media ± ES de las medidas individuales de los 20 frutos de cada lote y para la calidad del pedúnculo son la media ± ES de los valores individuales de los 20 frutos de cada uno de los 3 lotes.

Los sólidos solubles de todas las cerezas en el momento de recolección (día 0) oscilaron entre 20,7-20,9 g 100 g^{-1} y aumentaron durante la conservación a 2 ºC. Este aumento fue significativamente superior (p<0,05) en las cerezas de los árboles control con respecto a las de los árboles tratados durante todo el periodo de conservación, presentando un valor en el día 28 de 24,25 ± 0,29 g 100 g^{-1}. En el caso de los frutos de los árboles tratados, con melatonina 0,5 mM se alcanzó un valor de 22,58 ± 0,15 g 100 g^{-1}, significativamente inferior (p<0,05) a las otras dosis de 0,1 y 0,3 mM en los que el valor fue entre 23,3-23,7 g 100 g^{-1} (Figura 4A). Las cerezas presentaron una acidez valorable a día 0 de aproximadamente 1,35 g 100 g^{-1} en todos los casos. El efecto de los tratamientos ralentizó la

tendencia a disminuir la TA significativamente (p<0,05). Se observó una disminución mayor en los frutos control en los cuales se alcanzó un mínimo de 1,17 ± 0,02 g 100 g^{-1} el día 28 de conservación a 2 ºC, mientras que en las cerezas de los árboles tratados la acidez se mantuvo en unos valores superiores a 1,34 g 100 g^{-1} durante toda la conservación (Figura 4B).

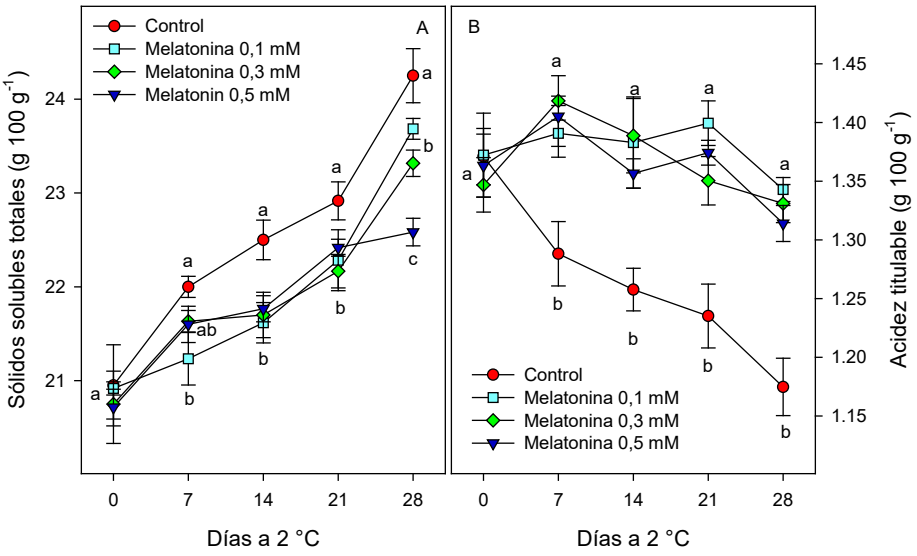


Figura 4. *Sólidos solubles (A) y acidez total (B) de las cerezas de los árboles control y de los tratados con melatonina (0,1, 0,3 y 0,5 mM) durante su conservación a 2 ºC. Para los sólidos solubles y la acidez los datos se muestran como la media ± ES de las dos medidas realizadas en el zumo proveniente de 50 g de la mezcla de las 20 cerezas de cada una de las tres repeticiones.*

El índice de madurez se mide como la relación de SST/AT. En el momento de recolección (día 0) el índice de madurez fue mínimo, alrededor de 15,3 en todas las cerezas de árboles tratados y control. A día 28 de conservación, en las cerezas control el índice de madurez alcanza un máximo de 20,70 ± 0,65, a diferencia de las cerezas de árboles tratados cuyo índice de madurez no supera 17,6 durante el periodo de conservación (datos no mostrados).

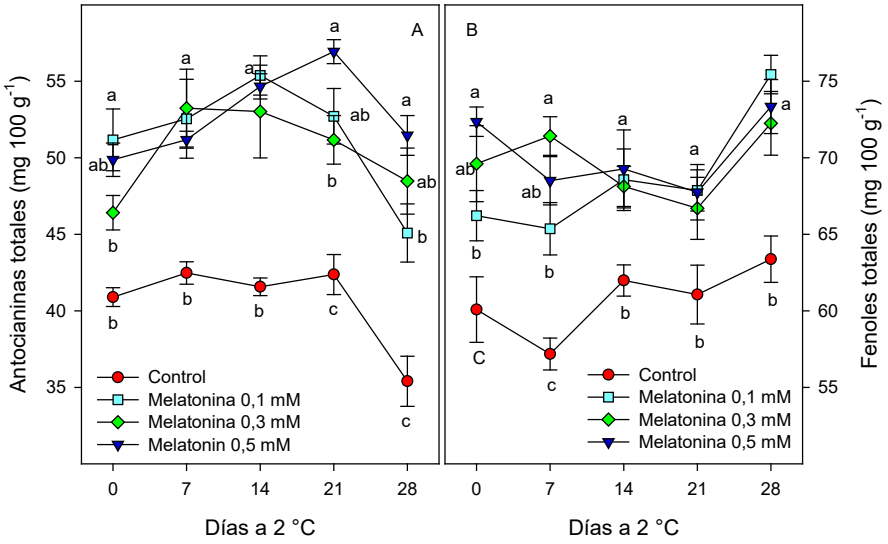


Figura 5. Antocianinas (A) y fenoles (B) totales de las cerezas de los árboles control y de los tratados con melatonina (0,1, 0,3 y 0,5 mM) durante su conservación a 2 ºC. Los datos se expresan como la media ± ES de las dos medidas realizadas en cada una de las muestras de las tres repeticiones.

Los valores de concentración de antocianinas totales mostraron diferencias significativas (p<0,05) entre las cerezas de los árboles tratados y las de los árboles control a lo largo de todo el periodo de conservación. Los valores se mantuvieron entre 45-55 mg 100 g^{-1} en las cerezas de los árboles tratados, mientras que en los controles las antocianinas no superaron los 42 mg 100 g^{-1} e incluso disminuyó su concentración hasta 35,40 ± 1,64 mg 100 g^{-1} el día 28 de conservación. Con el tratamiento melatonina 0,5 mM se alcanzó un máximo de 56,93 ± 0,78 mg 100 g^{-1} el día 14 de conservación a 2 ºC (Figura 5A). Por otra parte, la cantidad de fenoles totales en las muestras control fueron significativamente (p<0,05) menores que en las muestras de cerezas de árboles tratados durante el periodo de conservación a 2 ºC, aunque la tendencia general fue a aumentar ligeramente la cantidad de fenoles. La cantidad de fenoles totales aumentó de un valor de 57,2 a 63,4 mg 100 g^{-1} en las cerezas control. El día 0 de recolección los frutos de los árboles con tratamiento melatonina 0,5 mM son los que más concentración de polifenoles presentaron siendo este valor de 72,36 ± 0,96 mg 100 g^{-1}, pero son las cerezas de los árboles con dosis 0,1 mM los que mostraron mayor concentración de fenoles totales 75,44 ± 1,26 mg 100 g^{-1} el día 28 de conservación (Figura 5B).

Discusión

En estudios con granada, se ha demostrado recientemente que los tratamientos con melatonina incrementan la producción total en el granado 'Mollar de Elche', debido a un aumento en el tamaño de los frutos y en el número de frutos recolectados por árbol, en este caso, el mayor efecto se encontró con la concentración 0,1 mM (Medina-Santamarina et al., 2021a). Asimismo, la aplicación foliar de melatonina incrementa la producción en albaricoqueros de las variedades 'Caino' (Abd El-Naby et al., 2019), 'Colorado' y 'Mikado' (Medina-Santamarina et al., 2021b), así como la producción total y el tamaño de las bayas en uvas cuando se aplica unos días antes del envero (Meng et al., 2015). Estos resultados se han atribuido al efecto de la melatonina aumentando la fuerza sumidero de los frutos, lo que llevaría a una mayor acumulación de azúcares y mayor crecimiento, así como a un aumento de la fotosíntesis neta de la planta debido a un aumento de las clorofilas totales y de la superficie foliar.

El contenido en sólidos solubles y acidez total, contribuyen al sabor de las cerezas, ya que los consumidores prefieren cerezas con elevado contenido en azúcares, pero también con un nivel de acidez relativamente alto, lo que le da a la cereza ese punto de frescura característico. Además, la firmeza y el color son los otros dos atributos de calidad más apreciados por los consumidores (Serrano et al., 2005; Díaz-Mula et al., 2009). Los resultados de este trabajo muestran que los SST y la acidez en el momento de la recolección no se vieron afectados por los tratamientos con melatonina, por lo que los tratamientos no afectarían al sabor de las cerezas. Sin embargo, sí que se encontró un aumento significativo en los valores de firmeza y de color a* en las cerezas de los árboles tratados con respecto a las de los árboles control, en el momento de la recolección y por tanto, estos frutos con un color rojo más intenso y más firmes y jugosos serían más apreciados por los consumidores.

Por otra parte, el aumento en las pérdidas de peso y en los sólidos solubles, así como las disminuciones de firmeza y acidez total que se produjo durante la conservación a 2 ºC muestran la evolución del proceso de maduración y senescencia de la cereza durante su conservación post-recolección, lo que se manifiesta también como un aumento en el índice de madurez y conllevan a su pérdida de calidad que las hacen no aptas para la comercialización y el consumo (Giménez et al., 2015; Serrano et al., 2009). Sin embargo, es interesante señalar que todos estos parámetros evolucionaron más lentamente en las cerezas de los árboles tratados que en las de los controles, sin diferencias significativas entre las diferentes dosis de melatonina ensayadas. Estos datos muestran que los tratamientos con melatonina retrasaron el proceso de maduración y senescencia y por tanto, mantuvieron la calidad de estos frutos. Si se considera la evolución de todos los parámetros de calidad estudiados, podría concluirse que las cerezas control tendrían un tiempo máximo de conservación de dos semanas, mientras que las de los árboles tratados podrían conservarse hasta 4 semanas con unos parámetros de calidad óptimos para el consumo.

Asimismo, tratamientos post-recolección con melatonina han mostrado efectos beneficiosos manteniendo los parámetros de calidad y aumentando las posibilidades de conservación en otros frutos como plátanos, melocotones, peras, kiwi y fresas, según se recoge en la revisión de Ze et al. (2021), aunque la dosis y el tiempo de aplicación más efectivos dependen de la especie de fruto estudiado.

En frutos climatéricos, como plátanos (Hu et al., 2017), melocotones (Gao et al., 2016), o manzanas (Onik et al., 2021), el efecto de los tratamientos post-recolección retrasando la evolución del proceso de maduración durante la conservación en frío se ha atribuido a una reducción de la síntesis de etileno, debido a una inhibición de la actividad de los enzimas implicados en la biosíntesis de etileno, 1-aminocicoprano-1 carboxilato sintasa (ACC-sintasa) y ACC-oxidasa y a una reducción de la expresión de los genes que las codifican. Sin embrago, la cereza es un fruto no climatérico (Serrano et al., 2005), por lo que los efectos de los tratamientos con melatonina retrasando la maduración post-recolección no pueden deberse a una reducción de la biosíntesis de etileno. También en la granada, un fruto no climatérico, se ha comprobado que los tratamientos del árbol con melatonina retrasan la maduración post-recolección y mantienen la calidad durante más tiempo en comparación con los frutos control (Lorente-Mento et al., 2021). Estos efectos pueden se atribuidos a un incremento en la actividad de los enzimas antioxidantes, implicados en la eliminación de los radicales libres, los cuales se acumulan en los tejidos vegetales durante la senescencia y por tanto, su eliminación efectiva contribuye al retraso de este proceso en un amplio rango de frutos, incluida la cereza (Giménez et al., 2015).

Por otra parte, los fenoles, incluidas las antocianinas, también son compuestos antioxidantes, capaces de neutralizar los radicales libres, y que se vieron incrementados en las cerezas de los árboles tratados, tanto en el momento de la recolección como durante su conservación en frío. Por tanto, también podrían contribuir al retraso en la maduración, como se ha demostrado recientemente en granadas (Lorente-Mento et al., 2021). En cerezas, sólo hay un trabajo previo en el que publica que el tratamiento de los árboles con melatonina a 0,05 o 0,1 mM incrementó el contenido de fenoles en las cerezas en el momento de la recolección (Xia et al., 2020), aunque en ese trabajo no se realizó un estudio de conservación. Sin embargo, los efectos de los tratamientos post-cosecha con melatonina sobre los compuestos bioactivos y actividad antioxidante de los frutos durante la conservación sí que se ha estudiado en más casos. Así, por ejemplo, en la ciruela 'Santa Rosa', el tratamiento de inmersión post-cosecha con melatonina 0,1 mM condujo a niveles más altos de ácido ascórbico, fenoles totales y actividad antioxidante durante el almacenamiento en comparación con los controles (Bal, 2019), así como en fresas tratadas con 0,1 o 1 mM de melatonina (Liu et al., 2018). Asimismo, en la granada "Malas Saveh", Aghdam et al. (2020) han publicado recientemente que el tratamiento post-cosecha con melatonina 0,1 mM incrementa el contenido de antocianina y de fenoles durante el almacenamiento a 4 ºC, debido a una mayor actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), la primera enzima involucrada en la ruta de los fenilpropanoides. Finalmente, también en cereza, el tratamiento mediante inmersión en melatonina 0,1 mM aumentó el contenido de antocianinas durante el almacenamiento, debido a una sobreexpresión de dos genes que codifican para la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y la antocianidina 3-O-glucosiltransferasa (UFGT), que son dos enzimas clave involucradas en la última etapa de la biosíntesis de antocianina (Miranda et al., 2020).

Los fenoles y específicamente el grupo de las antocianinas son compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y reconocidos beneficios para la salud, reduciendo el riesgo de padecer enfermedades degenerativas como arterioesclerosis, diabetes, Alzheimer, enfermedades coronarias o ciertos tipos de cáncer (Luo et al., 2021). Por tanto, los efectos observados de los tratamientos con melatonina aumentando el contenido en fenoles y antocianinas de las cerezas podrían tener un efecto adicional incrementando los beneficios para la salud que aportan estos frutos (Faienza et al., 2020).

Conclusiones

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que los tratamientos pre-cosecha con melatonina durante el desarrollo de la cereza en el árbol, incrementan la producción de frutos comerciales de los

árboles, lo que mejoraría el rendimiento económico del cultivo. Además, algunos parámetros de calidad, como tamaño del fruto, firmeza y color también fueron más elevados en los frutos de los árboles tratados en el momento de la recolección. Durante la conservación en frío se observó un claro efecto de los tratamientos con melatonina retrasando el incremento en las pérdidas de peso, el deterioro del pedúnculo, el aumento de los SST y del índice de madurez y las pérdidas de firmeza y de acidez. Además, el contenido en compuestos antioxidantes, como fenoles y antocianinas totales, también se vio incrementado, tanto en la recolección como durante el almacenamiento posterior en frío. Por tanto, los tratamientos pre-cosecha con melatonina (aplicados en momentos clave del desarrollo del fruto) pueden considerarse un instrumento apto para mejorar el rendimiento de cultivo y la calidad organoléptica de las cerezas y sus propiedades beneficiosas para la salud, tanto en el momento de la recolección como después de su conservación en frío.

No obstante, aún falta mucho por conocer sobre el mecanismo de acción de la melatonina, aplicada como tratamiento exógeno, en el proceso de maduración de la cereza en el árbol y después de la recolección, especialmente en lo relacionado con los sistemas antioxidantes implicados en la reducción de radicales libres asociados a la sobre-maduración y senescencia de estos frutos. Estos aspectos serían de gran interés en futuras investigaciones.

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades la financiación recibida en el proyecto RTI2018-099664-B-I00 en el que se ha realizado este trabajo.

Bibliografía

Abd El-Naby, S.K.M., Mohamed, A.A.A. and El-Naggar, Y.I.M. (2019). Effect of melatonin, GA3 and NAA on vegetative growth, yield and quality of 'Canino' apricot fruits. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 18, 167-174.

Aghdam, M.S., Luo, Z., Li, L., Jannatizadeh, A., Fard, J.R. and Pirzad, F. (2020). Melatonin treatment maintains nutraceutical properties of pomegranate fruits during cold storage. Food Chemistry, 303,125385.

Arnao, M.B. and Hernández-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. Journal of Pineal Research 59(2), 133-150.

Bal E. (2019). Physicochemical changes in 'Santa Rosa' plum fruit treated with melatonin during cold storage. J. Food Meas. Charact. 13, 1713-1720.

Díaz-Mula, H. M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P. J., Guillén, F. and Serrano, M. (2009). Organoleptic, nutritive, and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. Food. Sci. Technol. Int, 15: 535-543.

Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W. and Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Pineal Research 18(1), 28-31.

Faienza, M.F., Corbo, F., Carocci, A., Catalano, A., Clodoveo, M.L., Grano, M., David, Q.H., Wang D'Amato, G., Muraglia, M., Franchinic, C., Brunetti, G. and Portincasa, P. (2020). Novel insights in health-promoting properties of sweet cherries. Journal of Functional Foods 69,103945.

Gao, H., Zhang, Z.K., Chai, H.K., Cheng, N., Yang, Y., Wang, D.N. (2016). Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit. Postharvest Biol. Technol., 118, 103-110.

Giménez, M.J., Valverde, J.M., Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Serrano, M., Moral, J. and Castillo S. (2015). Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees improve fruit quality at harvest and during storage. Sci. Hortic. 197, 665-673.

Hattori, A., Migitaka, H., Iigo, M., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T. and Reiter, R.J. (1995). Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. Biochemistry and Molecular Biology International 35(3), 627-634.

Hu, W., Yang, H., Tie, W.W., Yan, Y., Ding, Z., Liu, Y., Wu, C., Wang, J., Reiter, R.J., Tan, D.X., Shi, H.T., Xu, B.Y. and Jin, Z.Q. (2017). Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality. J Agric. Food Chem. 65, 9987-9904.

Kappel, F., Fisher-Fleming. B. and Hogue, E. (1996). Fruit Characteristics and Sensory Attributes of an Ideal Sweet Cherry. HortScience 31(3):443–446.

Liu, C.H., Zheng, H.H., Sheng, K.L., Liu, W. and Zheng, L. (2018). Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. Postharvest Biol. Technol., 139, 47-55.

Lorente-Mento, J.M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D. and Serrano M. (2021). Melatonin treatment to pomegranate trees enhances fruit bi-oactive compounds and quality traits at harvest and during postharvest storage. Antioxidants, 10(6), 820.

Luo, J., Si, H., Jia, Z. and Liu, D. (2021). Dietary anti-aging polyphenols and potential mechanisms. Antioxidants 10(2), 283, pp. 1-20.

Medina-Santamarina, J., Serrano, M., Lorente-Mento, J.M., García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., Valero, D. and Guillén, F. (2021a). Melatonin treatment of pomegranate trees increases crop yield and quality parameters at harvest and during storage. Agronomy, 11, 861.

Medina-Santamarina, J., Zapata, P.J., Valverde, J.M., Valero, D., Serrano, M. and Guillén, F. (2021b). Melatonin treatment of apricot trees leads to maintenance of fruit quality attributes during storage at chilling and non-chilling temperatures. Agronomy, 11, 917.

Meng, J.F., Xu, T.F., Song, C.Z., Yu, Y., Hu, F., Zhang, L., Zhang, Z.W. and Xi, Z.M. (2015). Melatonin treatment of pre-veraison grape berries to increase size and synchronicity of berries and modify wine aroma components. Food Chem. 185, 127–134.

Miranda, S., Vilches, P., Suazo, M., Pávez, L., García, K., Méndez, M.A., González, M., Meisel, L-A., Defilippi, B.G. and del Pozo, T. (2020). Melatonin triggers metabolic and gene expression changes leading to improved quality traits of two sweet cherry cultivars during cold storage. Food Chem. 319, 126360.

Onik, J.C., Wai, S.C., Li, A., Lin, Q., Sun, Q., Wang, Z. and Duan, Y. (2021). Melatonin treatment reduces ethylene production and maintains fruit quality in apple during postharvest storage. Food Chem. 337, 127753.

Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S. and Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. J. Agric. Food Chem., 53, 2741–2745.

Serrano, M., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M. and Valero, D. (2009). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. J. Agr. Food Chem. 57, 3240-3246.

Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S. and Reiter, R.J. (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. Journal of Experimental Botany 63, 2, 577–597.

Tijero, V., Muñoz, P. and Munne-Bosch S. (2019). Melatonin as an inhibitor of sweet cherries ripening in orchard trees. Plant Physiology and Biochemistry 140, 88-95.

Valero, D. and Serrano, M. (2010). Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality. Boca Raton: CRC Press; 288 p.

Xia, H., Shen, Y., Shen, T., Wang, X., Zhang, X., Hu, P., Liang, D., Lin, L., Deng, H., Wang, J., Deng, Q. and Lv, X. (2020). Melatonin accumulation in sweet cherry and its influence on fruit quality and antioxidant properties. Molecules, 25(3),753.

Ze, Y., Gao, H., Li, T., Yang, B. and Jiang Y. (2021). Insights into the roles of melatonin in maintaining quality and extending shelf life of postharvest fruits. Trends Food Sci. Technol. 109, 569-578.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

La aplicación precosecha de jasmonato de metilo incrementa el rendimiento y la calidad del cultivo de pimiento verde

A. Dobón-Suárez[1], M.J. Giménez[1], M.E. García-Pastor[1] y P.J. Zapata[1]

[1] Dept. Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, e-mail: alicia.dobon@goumh.umh.es

Resumen

El jasmonato de metilo (JaMe) es una hormona vegetal endógena derivada del ácido jasmónico (AJ) y ambos juegan un papel importante en el desarrollo de la planta, principalmente induciendo mecanismos de defensa contra patógenos y estreses abióticos, aunque también están involucrados en la regulación del crecimiento de los frutos y en la maduración. En el año 2020, se estudiaron los efectos del tratamiento de JaMe aplicado en precosecha a las concentraciones 0,1 y 1 mM sobre el rendimiento del cultivo en campo, así como sobre los parámetros de calidad y el contenido en compuestos bioactivos de la variedad de pimiento verde 'Herminio' en el momento de la recolección. El tratamiento mostró un incremento significativo del rendimiento para las dos concentraciones estudiadas en comparación con las plantas no tratadas o controles. Además, se observó una menor tasa de respiración en el momento de la recolección en aquellos pimientos que habían sido previamente tratados con JaMe, siendo la concentración 0,1 mM la que redujo en mayor medida la actividad metabólica. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al color. Sin embargo, los pimientos tratados con JaMe mostraron una firmeza, un contenido en sólidos solubles totales y acidez total significativamente superior a los pimientos control, principalmente los tratados en precosecha con la concentración 0,1 mM. Respecto al contenido en compuestos bioactivos, fenoles totales y vitamina C, así como la capacidad antioxidante, ambos parámetros se vieron estimulados significativamente en los pimientos tratados con JaMe, siendo nuevamente la concentración 0,1 mM la que mostró los mejores efectos en la mejora de la calidad funcional. En conclusión, el JaMe podría ser una buena estrategia para incrementar el rendimiento del cultivo y la calidad físico-química y funcional de los pimientos en el momento de la recolección, parámetros muy valorados por parte del agricultor y/o consumidor.

Palabras clave: fenoles, firmeza, JaMe, producción, vitamina C

Preharvest application of methyl jasmonate increases yield and quality of green pepper crop

Abstract

Methyl jasmonate (MeJa) is an endogenous plant hormone derived from jasmonic acid (JA) and both play an important role in plant development, mainly inducing defence mechanisms against pathogens and abiotic stresses, although they are also involved in fruit growth and ripening regulation. In 2020 season, the effects of MeJa treatment applied in preharvest at 0.1 and 1 mM concentrations on crop yield in the field, as well as on quality parameters and bioactive compounds content of 'Herminio' green pepper cultivar at harvest were studied. The treatment showed a significant increase on yield for both tested concentrations compared to untreated plants or controls. In addition, a lower respiration rate at harvest in those peppers that had been previously treated with MeJa was observed, being the 0.1 mM concentration the most effective to reduce the metabolic activity. On the other hand, no significant differences were observed among treatments with respect to colour. However, peppers treated with MeJa showed a significantly higher firmness, total soluble solids content and total acidity than control pepper fruit, mainly those treated in preharvest with 0.1 mM concentration. Regarding the bioactive compound content, total phenolics and vitamin C, as well as the antioxidant capacity, both parameters were significantly stimulated in MeJa treated pepper fruit, being again the 0.1 mM concentration the most effective improving the functional quality. In conclusion, MeJa could be a good tool to increase crop yield and the physico-chemical and functional quality of pepper fruit at harvest, being these parameters highly appreciated by the farmer and/or consumer.

Keywords: phenolics, firmness, MeJa, production, vitamin C

Introducción

El pimiento (*Capsicum annum* L.) es una planta hortícola de gran importancia económica a nivel mundial debido a que es muy apreciada en el mercado por sus características organolépticas (Blanco-Ríos et al., 2013), especialmente por su variabilidad de color y por presentar altos niveles en compuestos bioactivos (Cortés-Estrada et al., 2020). España se sitúa a nivel mundial como el cuarto país productor y exportador de pimiento con 1.470 toneladas al año, junto a otras naciones como China, México y Turquía (MAPAMA, 2020). Más concretamente, a nivel provincial, la producción de pimiento en España se encuentra liderada por Andalucía con 834.336 toneladas, seguida de la Región de Murcia con 163.989 toneladas (MAPAMA, 2018). Actualmente, existe un amplio abanico de variedades disponibles en el supermercado, la mayoría de las cuales cambian de color de verde a amarillo, naranja, rojo o morado cuando están completamente maduras. Sin embargo, el pimiento verde a menudo se cosecha antes de que madure por completo, y se ha visto cómo el estado fenológico y el momento de recolección son dos factores claves que pueden influenciar el contenido de compuestos bioactivos en este tipo de pimiento (Dobón-Suárez et al., 2021). Este fruto es rico en compuestos antioxidantes como fenoles, principalmente flavonoides, carotenoides, capsaicinoides y vitamina C (Cortés-Estrada et al., 2020). El consumo de estos compuestos bioactivos aporta efectos beneficiosos para la salud del consumidor por sus propiedades antioxidantes, protegiendo a las células del daño oxidativo y previniendo así el desarrollo de enfermedades degenerativas (Blanco-Ríos et al., 2013).

Sin embargo, a pesar de las múltiples cualidades que presenta dicho cultivo, la mayoría de los pimientos se producen hoy día con la aplicación intensiva de productos químicos nocivos para la salud humana y el medio ambiente, y el uso de estos productos aumenta cada año (Reyes y Cortéz, 2017). Esto ha desencadenado la necesidad de una búsqueda continua de nuevos métodos de producción que sean respetuosos con el medio ambiente (Márquez et al., 2013). Entre las distintas estrategias precosecha que están siendo abordadas en la actualidad, se encuentra la aplicación de fertilizantes orgánicos (Reyes-Pérez et al., 2018), microorganismos beneficiosos como las micorrizas (Rosales et al., 2017), productos bioactivos como el quitosano (Hadwiger, 2013) o la aplicación de elicitores como el jasmonato de metilo (JaMe), entre otros, en distintas frutas y/o hortalizas (Martínez-Esplá et al., 2014; 2017; García-Pastor et al., 2019; 2020; Serna-Escolano et al., 2019). Sin embargo, el estudio de métodos alternativos y respetuosos con el medio ambiente que mejoren el rendimiento y la calidad en el momento de la recolección del pimiento verde aún no ha sido abordado en profundidad y podría ser una potencial estrategia para promover el cultivo y la comercialización de esta hortaliza en beneficio tanto de agricultores como consumidores. Por ejemplo, un estudio reciente ha observado que la aplicación de Quitomax® como bioestimulante con quitosano a la concentración de 300 mg ha^{-1} en pimiento verde incrementó el rendimiento y mostró mayores indicadores de calidad nutricional de la hortaliza (Reyes-Pérez et al., 2019).

El jasmonato de metilo (JaMe) es una hormona vegetal endógena derivada del ácido jasmónico (JA) y ambos juegan un papel importante en el desarrollo de la planta actuando sobre la regulación de procesos fisiológicos como la floración, germinación, crecimiento y maduración del fruto, e induciendo resistencia sistémica como respuesta al estrés abiótico y biótico (Dar et al., 2015; Wasternack y Strnad, 2016; Serrano et al., 2018). Además, la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) lo ha clasificado como sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS). Concretamente en pimiento, existen numerosos trabajos que han estudiado los efectos que produce el tratamiento postcosecha con JaMe sobre la inducción de resistencia en el fruto contra la incidencia de daños por frío o 'chilling injury' (CI) durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Meir et al., 1996; Fung et al., 2004; Wang et al., 2019; Venkatachalam et al., 2018; Ma

et al., 2020; Seo et al., 2020), así como contra la aparición de podredumbres (Tzortzakis et al., 2016), incrementando su vida útil (Xu et al., 2018).

Sin embargo, no existe información disponible actualmente acerca del efecto del tratamiento precosecha con JaMe sobre el rendimiento del cultivo de pimiento verde, siendo este el objetivo principal del presente trabajo de investigación. Sin embargo, sí que encontramos un número limitado de artículos disponibles con respecto al efecto de este elicitor sobre el rendimiento, tamaño y peso de distintos productos vegetales, en los que se han obtenido resultados contradictorios (Martínez-Esplá et al., 2014; 2017; Portu et al., 2015; García-Pastor et al., 2019; 2020; Serna-Escolano et al., 2019). Por ejemplo, los tratamientos con JaMe en precosecha afectaron el rendimiento de las parras de uva de mesa de manera diferente dependiendo de la concentración aplicada (García-Pastor et al., 2019). Los tratamientos con JaMe 1, 5 y 10 mM disminuyeron el rendimiento total en las variedades de uva de mesa 'Crimson' y 'Magenta', siendo el efecto dependiente de la dosis y mayor en la variedad 'Crimson'. Sin embargo, cuando se aplicó este elicitor a menores concentraciones (0,01 y 0,1 mM) ambas incrementaron el rendimiento de las parras en comparación con las no tratadas, sin mostrar diferencias significativas entre las dosis ($p \geq 0,05$). Además, para las dos variedades se observó que el tratamiento con JaMe a la concentración de 0,1 mM, incrementó de forma significativa ($p < 0,05$) tanto la firmeza de las bayas como el contenido de SST en comparación con las bayas control, aunque sin mostrar diferencias en la AT entre tratamientos (García-Pastor et al., 2019). En este sentido, Wu et al. (2012) observaron que el tratamiento con JaMe 1 mM estimuló la acumulación de materia seca en coliflores al promover la síntesis de clorofila y aumentar la tasa neta fotosintética, la conductancia estomática y la concentración de CO_2 intracelular. En contraposición a los resultados publicados en uva de mesa, los tratamientos precosecha con JaMe a las concentraciones 1, 5 y 10 mM incrementaron significativamente ($p < 0,05$) el rendimiento del cultivo de la granada 'Mollar de Elche' (García-Pastor et al., 2020). Sin embargo, el tratamiento precosecha de JaMe 0,1, 0,5 y 1 mM no afectó al rendimiento del cultivo de limón en las variedades 'Fino' y 'Verna' en comparación con los árboles control (Serna-Escolano et al., 2019).

Material y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

El presente estudio se realizó durante el ciclo de cultivo del pimiento verde 'Lamuyo', variedad 'Herminio', en el año 2020. Las plantas de pimiento utilizadas en el presente experimento se cultivaron en un invernadero con techo de plástico localizado en El Raal (Murcia) y perteneciente a la empresa 'Hortalizas Sanper S.L.'. Se seleccionaron 130 plantas, distribuidas en 5 bloques al azar con 26 plantas cada bloque, por tratamiento, siendo estos: control (agua destilada) y jasmonato de metilo (JaMe) a dos concentraciones (0,1 y 1 mM), aplicados mediante pulverización foliar en 7 momentos clave a lo largo del ciclo de cultivo (Tabla 1). La equidistancia entre las fechas de aplicación de los tratamientos precosecha fue aproximadamente de unos 21 días tras el último tratamiento realizado, exceptuando el último pase que se alargó para encontrarse próximo al último corte comercial, y se escogió en base a la duración del ciclo de cultivo de esta variedad de pimiento y basándonos en experimentos previos realizados (datos no mostrados).

De acuerdo con el programa de cultivo habitual diseñado por la empresa para el ciclo temprano que presenta esta variedad de pimiento, se aplicó riego automático por goteo y niveles óptimos de nutrientes y se utilizó lana de roca como sustrato de suelo. A lo largo del ciclo de desarrollo y maduración del cultivo (febrero-julio) y, de acuerdo con una producción escalonada de dicho cultivo, se realizaron 10 recolecciones comerciales (Tabla 1), cuando el pimiento verde había alcanzado un estado fenológico y de madurez adecuado para su consumo, como se discute en un estudio reciente llevado a cabo en esta variedad (Dobón-Suárez et al., 2021). En este caso, la equidistancia entre las

fechas de recolección se estableció de acuerdo con los criterios comerciales de recolección de pimiento verde establecidos por la empresa. En los distintos cortes comerciales, se evaluaron los parámetros relacionados con el rendimiento del cultivo; rendimiento acumulado (kg planta^{-1} y número de pimientos planta^{-1}) y peso medio (g). Por otro lado, los parámetros de calidad del pimiento se evaluaron en el tercer corte (04 de mayo). Estos pimientos se seleccionaron de forma homogénea y representativa y se transportaron al laboratorio, desechándose aquellos que presentaban fisiopatías y/o daños mecánicos.

Tabla 1. Fechas de aplicación de los tratamientos con JaMe (A) y recolecciones realizadas a lo largo del ciclo de cultivo de la variedad de pimiento verde 'Herminio'(B).

Tabla 1A

Tratamientos	Fechas de aplicación
T1	24 de febrero
T2	17 de marzo
T3	06 de abril
T4	29 de abril
T5	19 de mayo
T6	09 de junio
T7	12 de julio

Tabla 1B

Recolecciones	Fechas de recolección
R1	06 de abril
R2	20 de abril
R3	04 de mayo
R4	14 de mayo
R5	26 de mayo
R6	04 de junio
R7	16 de junio
R8	26 de junio
R9	06 de julio
R10	17 de julio

Una vez en el laboratorio, se analizaron 5 réplicas (n = 5) de 5 pimientos, con un total de 25 pimientos por tratamiento. Los parámetros de calidad analizados en el momento de la recolección fueron: la tasa de respiración (mg CO_2 kg^{-1} h^{-1}), el color (° hue), la firmeza (N mm^{-1}), el contenido de sólidos solubles totales (SST; g sacarosa 100 g^{-1}) y la acidez total (AT; g ácido málico 100 g^{-1}), cuyos protocolos de medición son detallados por García-Pastor et al. (2020) y Dobón-Suárez et al. (2021). Todos los pimientos se cortaron por la mitad, eliminando tanto el pedúnculo como las semillas, para posteriormente obtener zumo de una mitad y congelar en N_2 líquido la otra mitad, manteniéndola a -80 °C hasta el análisis de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante.

Para la determinación de la calidad funcional de los tratamientos objeto de estudio, se cuantificó el contenido de fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico 100 g^{-1}), actividad antioxidante total hidrosoluble (AAT-H) y liposoluble (AAT-L) (mg equivalentes de Trolox 100 g^{-1}), y el contenido en vitamina C o ácido ascórbico (mg 100 g^{-1}) a través del análisis de sus dos formas: ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (DHA), de acuerdo con el protocolo descrito recientemente en pimiento verde (Dobón-Suárez et al., 2021).

El análisis estadístico se realizó sobre los parámetros agronómicos y analíticos. Las variables agronómicas analizadas fueron la producción acumulada, el número de frutos producidos y el peso medio de los mismos durante el ciclo de cultivo. El análisis estadístico de estas variables se llevó a cabo en 5 réplicas de 26 plantas (130 plantas en total) por tratamiento. Por otro lado, las determinaciones analíticas se realizaron en 5 réplicas de 5 pimientos (25 pimientos en total) por tratamiento. Los resultados se expresaron como la media ± ES. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) donde la fuente de variación fue el tratamiento precosecha realizado. La comparación de medias se llevó a cabo utilizando el test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey para determinar si las diferencias entre dichos tratamientos precosecha eran significativas para

un nivel de significancia de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software SPSS v.17.0 para Windows (SPSS, 2001, IBM Corporation, Armonk, NY, EE.UU.).

Resultados y Discusión

Efecto del jasmonato de metilo en parámetros de rendimiento del cultivo de pimiento verde.

Se evaluó el rendimiento acumulado (kg planta^{-1}) en todas las fechas de recolección llevadas a cabo por la empresa, desde abril hasta julio de 2020, y los resultados mostraron que, en la mayoría de ellas, el tratamiento con jasmonato de metilo (JaMe) a la concentración de 0,1 mM fue eficaz incrementando el rendimiento de las plantas de pimiento en comparación con las plantas control (Figura 1A). Específicamente, a partir del 26 de mayo, el tratamiento con JaMe 0,1 mM incrementó significativamente ($p < 0,05$) el rendimiento en comparación con el resto de tratamientos, observándose dicho efecto hasta el último corte (17 de julio). Sin embargo, el tratamiento con JaMe 1 mM no mostró diferencias significativas ($p \geq 0,05$) con respecto al control hasta alcanzar el penúltimo y último corte, el 06 y 17 de julio, respectivamente, donde fue significativamente superior ($p < 0,05$). El rendimiento acumulado en la última recolección (17 de julio) para las plantas de pimiento tratadas con JaMe a las concentraciones de 0,1 y 1 mM fue de 5,02 ± 0,05 y 4,76 ± 0,08 kg planta^{-1}, respectivamente. Ambos valores fueron significativamente superiores al rendimiento mostrado por las plantas no tratadas con JaMe, las cuales presentaron un rendimiento final acumulado de 4,44 ± 0,05 kg planta^{-1}, siendo el tratamiento de JaMe 0,1 mM el que mostró mejores resultados para dicho parámetro.

Este efecto en el incremento del rendimiento acumulado expresado como kg planta^{-1} se debió principalmente a que se recolectaron un mayor número de pimientos planta^{-1} en las plantas que habían sido pulverizadas foliarmente con JaMe 0,1 mM, como se puede observar en la Figura 1B. En concreto, dicho incremento en el número de pimientos producidos fue significativo ($p < 0,05$) en comparación con los controles a partir del 26 de mayo y se mantuvo hasta la última recolección (17 de julio), coincidiendo con el incremento observado para los kg planta^{-1} (Figura 1A). El número de pimientos producidos por las plantas tratadas con JaMe 0,1 mM en el último corte (17 de julio) fue de 26,35 ± 0,33 pimientos planta^{-1}, mientras que las plantas no tratadas con JaMe produjeron solamente 23,78 ± 0,38 pimientos planta^{-1}. Sin embargo, a pesar de que el tratamiento con JaMe 0,1 mM incrementó significativamente ($p < 0,05$) el peso medio de los pimientos (g) en algunas fechas de recolección a lo largo del ciclo de cultivo (06 de abril, 20 de abril, 14 de mayo, 26 de mayo, 26 de junio y 06 de julio), no mostró diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en el último corte (17 de julio), como se puede observar en la Figura 1C. Por lo tanto, el efecto del incremento del rendimiento acumulado (kg planta^{-1}) observado en el último corte (17 de julio) en las plantas tratadas con JaMe 0,1 mM se debió a que el tratamiento precosecha incrementó el número de frutos producidos por planta, pudiendo dicho efecto estar relacionado con un posible incremento en el número de flores por planta tras la aplicación foliar de JaMe (Figuras 1A y B).

En contraposición, el tratamiento con JaMe 1 mM no mostró un incremento significativo ($p \geq 0,05$) en el número de pimientos planta^{-1} en el último corte o fecha de recolección (17 de julio), como se puede observar en la Figura 1B. De esta forma, aunque dicho tratamiento incrementó el número de pimientos planta^{-1} en algunas recolecciones a lo largo del ciclo de producción, el efecto del incremento en el rendimiento acumulado expresado como kg planta^{-1}, observado en la última fecha de recolección, se debió principalmente a un incremento significativo ($p < 0,05$) en el peso medio de los pimientos tratados con JaMe 1 mM y recolectados en este punto del ciclo de cultivo (17 de julio), con ≈ 154 g, en comparación con los controles (≈ 142 g), como se muestra en la Figura 1C. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, donde el tratamiento precosecha de JaMe 0,1 mM condujo a un incremento en el rendimiento del cultivo con 0,58 kg planta^{-1} más que el control,

el tratamiento precosecha con JaMe 0,5 mM de plantas de alcachofa también condujo a un mayor rendimiento en comparación con las plantas control, con 0,55 kg planta^{-1} (Martínez-Esplá et al., 2017). De igual forma, el tratamiento precosecha con JaMe 0,5 mM de ciruelos incrementó el rendimiento del cultivo debido a que incrementó el tamaño y el peso del fruto en las variedades 'Black Splendor' y 'Royal Rosa' (Martínez-Esplá et al., 2014), mientras que su aplicación en viñedo no afectó al peso de la baya (Portu et al., 2015).

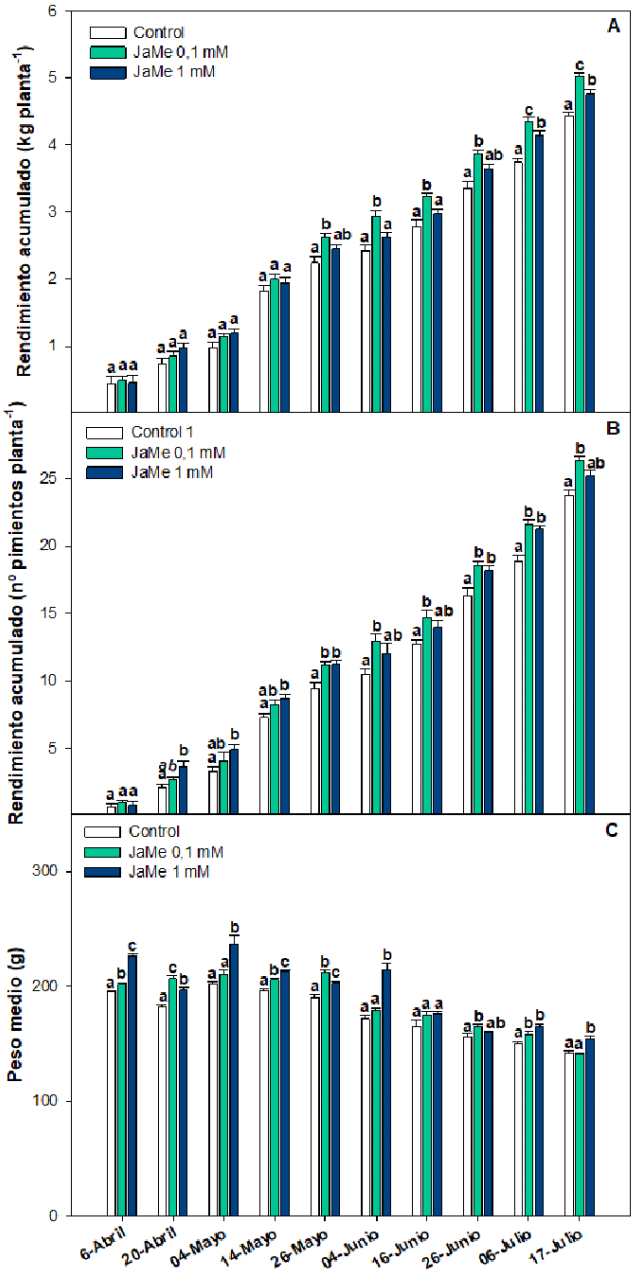


Figura 1. Rendimiento acumulado del cultivo, expresado en kg planta^{-1} **(A)** y número de pimientos planta^{-1} **(B)**, y peso medio (g) **(C)** de los pimientos tratados con JaMe a las concentraciones 0,1 y 1 mM y no tratados o controles en 10 fechas de recolección a lo largo del ciclo de cultivo de la variedad de pimiento verde 'Herminio'. Diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para cada una de las fechas de recolección.

Efecto del jasmonato de metilo en la tasa de respiración y parámetros físico-químicos del pimiento verde en la tercera recolección.

La tasa de respiración de los pimientos fue significativamente inferior ($p < 0,05$) en aquellos que habían sido recolectados de las plantas tratadas con JaMe 0,1 mM en comparación con los controles (Tabla 2), sin observar diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre estos últimos y los tratados con JaMe a la mayor concentración (1 mM). En un estudio donde las plantas de alcachofa fueron tratadas con JaMe 0,5 mM en precosecha, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a dicho parámetro metabólico (Martínez-Esplá et al., 2017). Sin embargo, granados tratados en precosecha con JaMe 5 mM produjeron frutos con unos valores de tasa de respiración relativamente bajos e inferiores a los no tratados (García-Pastor et al., 2020). Efectos similares sobre la reducción de la tasa de respiración por parte del tratamiento precosecha con JaMe se han observado tanto en el momento de la recolección como durante el almacenamiento postcosecha en ciruelas por Zapata et al. (2014), relacionándose dicho efecto con una reducción de la tasa del metabolismo celular y con un retraso en el proceso de senescencia durante el almacenamiento por parte del tratamiento.

Respecto al color, la medición del ángulo hue no mostró diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los tratamientos estudiados (Tabla 2), al igual que se ha observado en alcachofas tratadas con JaMe 0,5 mM (Martínez-Esplá et al., 2017). Sin embargo, la firmeza de los pimientos verdes tratados con JaMe fue significativamente superior ($p < 0,05$) en comparación con los pimientos control (Tabla 2). Específicamente, los pimientos recolectados de las plantas control mostraron unos valores de firmeza de un 14 y 38 % inferiores a los de las plantas tratadas con JaMe 1 y 0,1 mM, respectivamente. Por tanto, el tratamiento con JaMe a la concentración de 0,1 mM fue el más efectivo incrementando los valores de firmeza en el momento de la recolección y mostrando un retraso en la tasa de ablandamiento de la hortaliza. Resultados similares acerca del efecto del tratamiento con JaMe 0,5 mM incrementando la firmeza en el momento de la recolección han sido previamente publicados en ciruelas 'BlackSplendor' y 'Royal Rosa' (Martínez-Esplá et al., 2014).

Tabla 2. Tasa de respiración y parámetros físico-químicos; color (ángulo hue), firmeza, contenido en sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT), de los pimientos tratados con JaMe a las concentraciones 0,1 y 1 mM y no tratados en el momento de la recolección (04 de mayo) de la variedad de pimiento verde 'Herminio'. Diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para cada uno de los parámetros analizados.

Parámetros	Control	JaMe 0,1 mM	JaMe 1 mM
Tasa de respiración (mg CO_2 kg^{-1} h^{-1})	93,41 ± 4,33 b	78,67 ± 3,39 a	82,03 ± 3,26 ab
Ángulo hue (° h)	125,50 ± 0,48 a	124,47 ± 0,40 a	124,64 ± 0,33 a
Firmeza (N mm^{-1})	3,90 ± 0,19 a	6,26 ± 0,39 c	4,54 ± 0,16 b
SST (g sacarosa 100 g^{-1})	4,38 ± 0,01 a	4,68 ± 0,07 b	4,73 ± 0,04 b
AT (g ácido málico 100 g^{-1})	0,14 ± 0,0005 a	0,17 ± 0,0056 b	0,16 ± 0,0039 b

Finalmente, el contenido de SST y AT cuantificado durante el análisis destructivo del pimiento verde mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los pimientos tratados con JaMe y los controles (Tabla 2), siendo superior en los pimientos tratados. A su vez, es probable que el tratamiento con JaMe aumente los fotoasimilados disponibles para apoyar el crecimiento de la hortaliza.

Efecto del jasmonato de metilo en los parámetros funcionales del pimiento verde en la tercera recolección.

Con respecto al contenido de compuestos fenólicos, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en los pimientos pulverizados con JaMe 0,1 mM en comparación con los otros dos tratamientos, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$), como se puede observar en la Tabla 3. Sin embargo, ambas concentraciones de JaMe (0,1 y 1 mM) incrementaron significativamente ($p < 0,05$) la actividad antioxidante, tanto de la fase hidrosoluble (AAT-H) como de la liposoluble (AAT-L), así como el contenido de ácido ascórbico en su forma activa (AA), sin mostrar diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ambas dosis (Tabla 3). Pero cabría resaltar que el contenido de ácido dehidroascórbico (DHA) es una fracción importante cuyo aporte junto al de la fracción activa (AA) conforman el contenido total de vitamina C o ácido ascórbico que consumimos tras la ingesta de la hortaliza. Por ello, pese a que no se observaron diferencias entre ambas concentraciones de JaMe en el nivel de AA, dicho contenido de DHA sí mostró un incremento significativamente superior ($p < 0,05$) en los pimientos tratados con la concentración de JaMe 0,1 mM (Tabla 3). En conclusión, el tratamiento precosecha con JaMe a la concentración más baja estudiada (0,1 mM) sería el más efectivo incrementando el contenido en compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de los pimientos tratados en precosecha y mejorando la funcionalidad de la hortaliza.

Tabla 3. Parámetros funcionales; contenido de fenoles totales, actividad antioxidante hidrosoluble (AAT-H), actividad antioxidante liposoluble (AAT-L) y contenido de ácido ascórbico (AA) y dehidroascórbico (DHA), de los pimientos tratados con JaMe a las concentraciones 0,1 y 1 mM y no tratados o controles en el momento de la recolección (04 de mayo) de la variedad de pimiento verde 'Herminio'. Diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para cada uno de los parámetros analizados.

Parámetros	Control	JaMe 0,1 mM	JaMe 1 mM
Fenoles totales (mg 100 g^{-1})	84,98 ± 1,02 a	96,15 ± 3,17 b	93,81 ± 5,09 ab
AAT-H (mg 100 g^{-1})	102,28 ± 5,57 a	129,03 ± 1,47 b	126,79 ± 5,50 b
AAT-L (mg 100 g^{-1})	13,36 ± 1,15 a	18,74 ± 0,98 b	17,42 ± 0,51 b
AA (mg 100 g^{-1})	50,35 ± 7,93 a	86,35 ± 6,40 b	84,41 ± 4,89 b
DHA (mg 100 g^{-1})	15,82 ± 1,14 a	21,81 ± 0,58 b	15,74 ± 0,27 a

No existen publicaciones previas sobre el efecto del tratamiento precosecha con JaMe en plantas de pimiento sobre el contenido en compuestos bioactivos, aunque existe información reciente acerca del efecto del tratamiento en otros cultivos. El efecto del tratamiento con JaMe sobre el incremento en el contenido fenólico podría atribuirse a su papel como inductor a través de la activación de la vía fenilpropanoide, que es una de las respuestas de defensa inducibles que conduce a la acumulación de dichos compuestos y, por tanto, mejorando los beneficios para la salud del consumo de la hortaliza, como ha sido previamente sugerido por Martínez-Esplá et al. (2017) en plantas de alcachofa. De hecho, resultados similares han sido publicados en granadas 'Mollar de Elche' tratadas en precosecha con JaMe 1, 5 y 10 mM donde se observó que el tratamiento con JaMe incrementó el contenido de fenoles totales, la actividad antioxidante hidrosoluble y liposoluble, así como el contenido de vitamina C o ácido ascórbico en el momento de la recolección, siendo la concentración de 5 mM la que mostró un mayor efecto (García-Pastor et al., 2020).

Conclusiones

La aplicación precosecha de jasmonato de metilo (JaMe) como elicitor en el cultivo de pimiento verde a la concentración de 0,1 mM puede ser una buena estrategia para incrementar el rendimiento acumulado del cultivo, expresado como kg $planta^{-1}$ y número de pimientos $planta^{-1}$, así como la calidad físico-química, ya que los pimientos tratados presentaron una mayor firmeza y contenido en SST y AT junto a una menor actividad metabólica de la hortaliza en el momento de la recolección. Por otro lado,

dicho tratamiento también podría mejorar la calidad funcional de los pimientos tratados en el momento de la recolección, determinada por un incremento en el contenido de compuestos bioactivos (fenoles y ácido ascórbico) y estimulación de la actividad antioxidante de la hortaliza. Todos los parámetros evaluados son parámetros muy valorados por parte del agricultor y/o consumidor, por lo que una mejora de los mismos por parte del tratamiento con JaMe podría potenciar el cultivo y la comercialización de la hortaliza.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) 'Herramientas Pre- y postcosecha para la comercialización de pimiento ecológico (IDI-20191227)' en colaboración con la empresa 'Hortalizas Sanper S.L.' (El Raal, Murcia, Spain). Los autores agradecen a dicha empresa el asesoramiento técnico recibido, así como las instalaciones (invernaderos) y el material vegetal utilizado para la realización del experimento, y a la Universidad Miguel Hernández (UMH) por la prestación de los laboratorios y equipos para la determinación de los análisis.

Bibliografía

Blanco-Ríos, A.K., Medina-Juárez, L.A., González-Aguilar, G.A., Gámez-Meza, N., 2013. Antioxidant activity of the phenolic and oily fractions of different sweet peppers. J. Mex. Chem. Soc. 57, 137-143. https://doi.org/10.29356/jmcs.v57i2.226.

Cortés-Estrada, C.E., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Castañeda-Pérez, E., Meza-Márquez, O.G., López-Cortez, M.S., Hernández-Martínez, D.M., 2020. Prediction of total phenolics, ascorbic acid, antioxidant capacities, and total soluble solids of *Capsicum annuum* L. (bell pepper) juice by FT-MIR and multivariate analysis. LWT 126, 109285. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109285.

Dar, T.A., Uddin, M., Khan, M.M.A., Hakeem, K.R., Jaleel, H., 2015. Jasmonates counter plant stress: a review. Environ. Exp. Bot. 115, 49-57. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.02.010.

Dobón-Suárez, A., Giménez, M.J., Castillo, S., García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., 2021. Influence of the Phenological Stage and Harvest Date on the Bioactive Compounds Content of Green Pepper Fruit. Molecules 26, 3099. https://doi.org/10.3390/molecules26113099.

Fung, R.W.M., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tian, M., 2004. MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). Plant Sci. 166, 711-719. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.009.

García-Pastor, M.E., Serrano, M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P.J., 2019. Methyl jasmonate effects on table grape ripening, vine yield, berry quality and bioactive compounds depend on applied concentration. Sci. Hortic. 247, 380-389. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.043.

García-Pastor, M.E., Serrano, M., Guillén, F., Giménez, M.J., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P.J., 2020. Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. J. Sci. Food Agric. 100, 145-153. https://doi.org/10.1002/jsfa.10007.

Hadwiger, L., 2013. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. Plant Sci. 28, 42-49.

Ma, M., Zhu, Z., Cheng, S., Zhou, Q., Zhou, X., Kong, X., Hu, M., Yin, X., Wei, B., Ji, S., 2020. Methyl jasmonate alleviates chilling injury by regulating membrane lipid composition in green bell pepper. Sci. Hortic. 266, 109308. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109308.

MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2018. Anuario de Estadística. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-MAPAMA: producciones-anuales-cultivos/ (Último acceso: 11 agosto 2021).

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2020. Anuario de Estadística. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/ (Último acceso: 11 agosto 2021).

Márquez, C., López, S., Cano, P., Moreno, A., 2013. Fertilización orgánica: una alternativa para la producción de chile Piquín bajo condiciones protegidas. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 19, 279-286.

Martínez-Esplá, A., Valero, D., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Giménez, M.J., García-Pastor, M.E., Serrano, M., Zapata, P.J., 2017. Preharvest Application of Methyl Jasmonate as an Elicitor Improves the Yield and Phenolic Content of Artichoke. J. Agric. Food Chem. 65, 9247-9254. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03447.

Martínez-Esplá, A., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., 2014. Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 1. Improvement of fruit growth and quality attributes at harvest. Postharvest Biol. Technol. 98, 98-105. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.011.

Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiro, B., Cohen, E., Fuchs, Y., 1996. Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. Can. J. Bot. 74, 870-874. https://doi.org/10.1139/b96-108.

Portu, J., Santamaría, P., López-Alfaro, I., López, R., Garde-Cerdán, T., 2015. Methyl jasmonate foliar application to Tempranillo vineyard improved grape and wine phenolic content. J. Agric. Food Chem. 63, 2328-2337. https://doi.org/10.1021/jf5060672.

Reyes, G., Cortéz, D., 2017. Intensidad en el uso de fertilizantes en América Latina y el Caribe (2006-2012). Bioagro 29, 45-52.

Reyes-Pérez, J.J., Enríquez-Acosta, E.A., Ramírez-Arrebato, M.A., Rodríguez-Pedroso, A.T., Lara-Capistrán, L., Hernández-Montiel, L.G., 2019. Evaluation of the growth, yield and nutritional quality of pepper fruit with the application of Quitomax®. Cien. Inv. Agr. 46(1), 23-29. https://doi.org/10.7764/rcia.v46i1.2002.

Reyes-Pérez, J.J., Luna, R., Vázquez-Morán, V., Zambrano-Burgos, D., Torres, J., 2018. Efecto de abonos sobre la respuesta productiva en el tomate (*Solanum lycopersicum* L). Rev. Fac. Agron. (Luz) 35, 26-39.

Rosales, P.R., González Cañizares, P.J., Ramírez Pedroso, J.F., Arzola Batista, J., 2017. Selección de cepaseficientes de hongos micorrízicos arbusculares para el pasto guinea (*Megathyrsus maximus* cv. Likoni). Cultivos Tropicales 38, 24-30.

Seo, J., Yi, G., Lee, J.G., Choi, J.H., Lee, E.J., 2020. Seed browning in pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit during cold storage is inhibited by methyl jasmonate or induced by methyl salicylate. Postharvest Biol. Technol. 166, 111210. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111210.

Serna-Escolano, V., Valverde, J.M., García-Pastor, M.E., Valero, D., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Zapata, P.J., Serrano, M., 2019. Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters. J. Sci. Food Agric. 99(11), 5035-5043. https://doi.org/10.1002/jsfa.9746.

Serrano, M., Martínez-Esplá, A., Zapata, P., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J.M., Valero, D., 2018. Effects of methyl jasmonate treatment on fruit quality properties. In: Barman, K., Sharma, S., Siddiqui, M.W. (Eds.), Emerging Postharvest Treatment of Fruits and Vegetables. Apple Academic Press, Oakville, Canada, pp. 85-106 (Chapter 4).

Tzortzakis, N., Chrysargyris, A., Sivakumar, D., Loulakakis, K., 2016. Vapour or dipping applications of methyl jasmonate, vinegar and sage oil for pepper fruit sanitation towards grey mould. Postharvest Biol. Technol. 118, 120-127. http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.004.

Venkatachalam, K., Thongbour, P., Nagarajan, M., 2018. Effects of methyl jasmonate fumigation and packaging on chilling injury and physiochemical quality changes of stored green bell peppers. Carpathian J. Food Sci. Technol. 10(2), 120-132.

Wang, Y., Gao, L., Wang, Q., Zuo, J., 2019. Low temperature conditioning combined with methyl jasmonate can reduce chilling injury in bell pepper. Sci. Hortic 243, 434-439. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.031.

Wasternack, C., Strnad, M., 2016. Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. N. Biotechnol. 33, 604-613. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.001.

Wu, H., Wu, X., Li, Z., Duan, L., Zhang, M., 2012. Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in cauliflower (*Brassica oleracea* L.) seedlings treated with methyl jasmonate and coronatine. J. Plant Growth Regul. 31, 113-123. https://doi.org/10.1007/s00344-011-9224-x.

Xu, D.-Y., Liu, J., Zuo, J.-H., Gao, L.-P., Wang, Q., 2018. Effect of Methyl Jasmonate Treatment on Quality of Postharvest Pepper Subjected Vibration during Transportation. Mod. Food Sci. Technol. 34, 70-76. https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.012.

Zapata, P.J., Martínez-Esplá, A., Guillén, F., Díaz-Mula, H.M., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D., 2014. Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. Postharvest Biol. Technol. 98, 115-122. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.012.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Caracterización temporal del limón mediterráneo para su aprovechamiento en la industria del zumo

M.J. Rubio-Martínez, M.J. Giménez, M.E. García-Pastor, V. Serna-Escolano y P.J. Zapata

Dept. Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, e-mail: maria.rubio24@goumh.umh.es

Resumen

En la actualidad, el cultivo de los cítricos está profundamente arraigado al sureste español. En concreto, la especie predominante es la naranja, seguida del limón y la mandarina. El limón, tiene una mayor presencia en las provincias de Alicante y Murcia y, aunque su mayor valor de comercialización lo obtiene cuando se hace en fresco, la industria del zumo tiene un papel primordial, ya que absorbe una gran cantidad de producción, que no es apta para su venta en fresco, o que debido a los excedentes de campaña no puede ser puesta en los mercados europeos. Estas industrias en su mayoría llevan a cabo la concentración del zumo, lo que permite un mayor aprovechamiento de los recursos de almacenamiento y transporte. Los componentes de calidad que estas empresas manejan, se basan fundamentalmente en el contenido en sólidos solubles totales, acidez titulable y contenido en aceites. Por ello, en el presente trabajo se lleva a cabo una caracterización de la fruta durante dos campañas, que nos permita dilucidar cómo varían estos componentes de calidad durante el ciclo productivo, cómo afectan los diferentes años, e incluso como interviene el tipo de cultivo, convencional o ecológico. Los resultados han mostrado que, aunque los parámetros de calidad son elevados, éstos varían en el tiempo sin encontrar diferencias significativas por el tipo de cultivo a lo largo del ensayo, pero sí diferencias puntuales en determinadas épocas del año.

Palabras clave: Sólidos solubles totales, acidez titulable, aceites esenciales, zumo concentrado

Temporal characterization of Mediterranean lemon for its use in the juice industry

Abstract

Currently, citrus crop is deeply rooted in the southeast of Spain. Specifically, the predominant species is orange, followed by lemon and mandarin. Lemon has a greater presence in Alicante and Murcia provinces and, although its greatest commercialization value is obtained when it is made in fresh, the juice industry plays a key role, since it absorbs a large amount of production, which wether it is not suitable for sale in fresh, or that due to campaign surpluses, it cannot be placed into European markets. These industries mostly carry out the concentration of the juice, which allows a better use of storage and transportation resources. The quality components that these companies handle are mainly based on total soluble solids content, titratable acidity and oil content. Thus, in the present work a fruit characterization is carried out during two seasons, which allows us to elucidate how these quality components vary during the production cycle, how the different years affect, and even how the type of crop intervenes, conventional or ecological. The results have shown that although the quality parameters are high, they vary over time without finding significant differences due to the type of crop throughout the experiment, but there are specific differences at certain periods of the year.

Keywords: total soluble solids, titratable acidity, essential oils, juice concentrate

Introducción

Citrus limon (L.) Burm., conocido comúnmente como limonero pertenece a la familia de las *Rutaceae*. Su fruto, es el limón, un híbrido entre *Citrus medica* y *Citrus aurantium*, siendo utilizado como ingrediente en gran variedad de bebidas y comidas. Además, se utiliza como conservante en determinados alimentos, debido a sus propiedades antioxidantes.

El cultivo de los cítricos, concretamente el limón (*Citrus limon*) tiene lugar en todo el mundo, pero más concretamente en países tropicales, semitropicales y templados-cálidos como la Región Mediterránea (EOL, 2017). Los principales países productores de limón son India, México, China, Argentina y Brasil (Mamede et al., 2020). No obstante, España, se sitúa primera en el ranking a nivel europeo, seguido de Turquía e Italia (Bozzano et al., 2021), con un total de producción contabilizada de 1.198.978 toneladas en el año 2020, representando un 64% del limón comunitario europeo (AILIMPO). La producción de *Citrus limon* se sitúa sobre el 5,4% de la demanda de fruta fresca (Matteo et al., 2021), siendo exportada y comercializada a través de la industria del fresco, aunque es parcialmente absorbida y procesada por la industria alimentaria de procesamiento de cítricos (Gema Nieto et al., 2021).

Existen diferentes variedades de limón cultivadas en España; Fino o primaflori, Eureka y Verna, teniendo diferentes etapas de recolección, permitiendo por ello un abastecimiento prácticamente continuo en el mercado en fresco. La recolección del limón Fino o primaflori es la recolección más larga de las tres variedades y se extiende desde Septiembre hasta Abril. Por otro lado, la recolección de la variedad Eureka empieza en Octubre y termina en Febrero. Y por último, la recolección de la variedad Verna es la más tardía, empezando en Febrero y terminando en Junio (Pardo et al., 2016).

La calidad de la fruta está directamente relacionada con diferentes cambios fisiológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el crecimiento y desarrollo de la misma (Mukhim et al., 2015). Es por ello, que el estudio de los parámetros de calidad del zumo permite identificar la etapa óptima de maduración de la fruta, siendo éste un parámetro esencial para garantizar altos estándares de calidad de la fruta y por tanto, del zumo obtenido (Matteo et al., 2021). Tanto los SST (sólidos solubles totales) como la AT (acidez titulable) son dos parámetros que han sido relacionados con el avance en el proceso de maduración en frutos cítricos como la naranja dulce, presentando en estudios una reducción en los niveles de AT y un aumentos en el contenido de SST (Ladanya., 2008). Los SST del limón deben situarse por encima de 6,5 ºBrix para su aceptación en la industria cítrica. Por otro lado, los ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico, tartárico) tienden a disminuir a medida que el fruto madura, aumentando así la relación con los sólidos solubles totales. La relación sólidos solubles/acidez, también llamada índice de madurez, es fundamental en el limón para conocer el estado de maduración de éste, por lo que es un atributo físico-químico, muy valorado por la industria (Redd et al., 1986).

En el aceite esencial de limón se consideran dos parámetros básicos de calidad, el poder rotatorio y el contenido en aldehído. El contenido en aldehído, expresado como % de citral es usado como índice de calidad del aceite por ser el principal responsable del aroma de este producto. Existe una tendencia general donde los valores más altos suelen darse a principio de campaña en los meses enero/febrero, disminuyendo a medida que avanza la campaña. La rotación óptica es una propiedad que poseen los aceites esenciales de cítricos al producir una rotación dextrógira del plano de luz polarizada (Albadalejo., 1999) debido al contenido de dos componentes mayoritarios del aceite esencial de limón

como el d-limoneno (dextrógiro) y el β-pineno (levógiro). Según la norma de calidad ISO 592 (2017) los valores de rotación óptica deben estar comprendidos entre +57º y + 65º.

Por todo lo anteriormente expuesto, el trabajo consiste en llevar a cabo la determinación de los componentes de calidad en zumo (SST y AT) y aceite esencial (rotación óptica y aldehídos) de limón durante dos campañas (19-20 y 20-21) para productos obtenidos a partir de cultivos de limón en convencional y ecológico, determinando así las diferencias entre campañas y el formato de producción del limón.

Materiales y métodos

Materia prima de frutas

En la industria de la transformación del cítrico "*Citrus limon*" se obtienen diferentes productos como es el zumo, el concentrado, el aceite esencial, la pulpa y la corteza (Comparetti et al., 2016), siendo los dos primeros (zumo y aceite esencial) objeto de estudio en el presente trabajo. Las muestras analizadas fueron tomadas durante dos campañas consecutivas: 2019-2020 y 2020-2021, donde se produjo una gran cantidad de excedente de la industria del fresco hacía la industria del zumo. Los limones procesados tenían origen en España, proviniendo del sureste español (Murcia, Almería, Vega Baja de la Comunidad Valencia y Málaga). Durante las campañas 2019-2020 y 2020-2021 se procesaron 500.000 millones de Kg de limones, siendo una buena cifra en la industria del cítrico. Las muestras de zumo de limón fueron tomadas tras el proceso de transformación del limón con extractoras "Excel" y posterior homogeneización de la producción diaria en tanques isotérmicos. El zumo se analizó directamente tras la producción, previo al almacenamiento prologando al que se somete posteriormente. Por otro lado el aceite esencial de limón, se obtiene tras la transformación del limón con extractoras "Excel" y posterior procesado denominado *prensado en frío* o *cold pressed*. Las muestras son de producciones diarias, almacenadas en tanques de decantación e isotérmicos para su conservación. Todas las muestras de zumos y aceites se identificaron perfectamente por el tipo de tratamiento sufrido por el cultivo; convencional o ecológico.

Características físico-químicas del zumo

Los parámetros básicos de calidad del zumo son el contenido en solidos solubles, y la acidez total titulable. Todos los parámetros físico-químicos determinados del zumo de limón se realizaron en muestras de zumo de limón tras su transformación, sin almacenamiento previo.

- **Sólidos solubles**

El contenido en sólidos solubles se determinó por el método analítico de referencia IFU 8 de A.I.J.N. (Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community). A efectos prácticos, representa el porcentaje en peso de azúcar en el producto. Los valores obtenidos se determinaron por medición directa en el zumo de limón con refractómetro digital con sistema de compensación de temperatura a 20ºC de Bellingham + Stanley RFM340-T (Reino Unido). Todas las mediciones se realizaron por triplicado (n=3).

- **Acidez titulable**

La acidez titulable del zumo se determinó por el método analítico de referencia IFU 3 de A.I.J.N, titulando con 0,1N NaOH hasta alcanzar pH 8,1 con un valorador automático HANNA HI931-02 (País Vasco). Los valores son expresados como % A.C.A, indicando el contenido de ácido cítrico anhídrido presente en la muestra de zumo de limón. Sin embargo, es conocido que otros ácidos como el málico y el oxálico también contribuyen a este valor. Todas las mediciones se realizaron por triplicado (n=3).

Características físico-químicas del aceite

En el aceite de limón se analizan parámetros básicos de calidad como son el índice de refracción, la rotación óptica, y el contenido de aldehído.

- **Índice de refracción**

El valor de este parámetro se determinó por medición directa con el refractómetro Bellingham + Stanley RFM340-T (Reino Unido) a una temperatura dada de 20ºC. Todas las mediciones se realizaron por triplicado (n=3).

- **Rotación óptica**

La rotación óptica en el aceite esencial de limón se produce por la relación de las proporciones entre sus dos componentes mayoritarios (limoneno de naturaleza dextrógira y β-pineno de naturaleza levógira). Los aceites esenciales cuando se colocan en un haz de luz polarizada, poseen la propiedad de rotar el plano de polarización hacia la derecha (dextrógiro) o hacia la izquierda (levógiro). Para las determinaciones se empleó un polarímetro ATAGO Polax-D obteniendo un valor en grados de rotación, siendo éste junto con la dirección importantes como criterios de pureza. La medida de realiza a 20ºC, con un tubo de 100mm donde se introduce el aceite esencial, no dejando ninguna burbuja de aire y posteriormente se introduce en el polarímetro para su lectura. (Redd et al., 1986). Todas las mediciones se realizaron por triplicado (n=3).

- **Contenido de aldehído**

El contenido de citral del aceite esencial de limón expresado como % de aldehído se determinó por el análisis de aldehído U.S.P. (United States Regulations Pharmacopia Requirements). El método se basa en la liberación de ácido clorhídrico que se produce al oximar los grupos carbonilos con el clorhidrato de hidroxilamina. La determinación se realiza en una muestra de aceite esencial junto con una disolución de hidroxilamina, previamente ajustada a pH 3,4. Transcurridos 30 minutos, el ácido clorhídrico liberado se valora con una solución de hidróxido sódico 0,1N hasta alcanzar un pH 3,4 mediante un pH-metro (Mettler Toledo, Barcelona), obteniendo así el % de aldehído contenido en la muestra. El análisis se realizó por triplicado (n=3) en cada una de las muestras.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media de tres réplicas aleatorias. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y se realizó una comparación múltiple con el método Fisher LSD para encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los resultados obtenidos en cada tipo de cultivo por mes. Mientras para analizar si existían diferencias en las medias resultantes para los dos tipos de cultivo, convencional y ecológico, se aplicó la T de Student. Para ello se utilizó el programa SPSS, versión 22 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.).

Resultados y discusión

En la industria del zumo de limón, el calendario de producción es anual, ya que, aunque la mayor parte de la materia prima es procedente de las producciones nacionales. Los meses de julio y agosto se procesan frutos importados de países del hemisferio sur, sin embargo, estas cantidades son minoritarias.

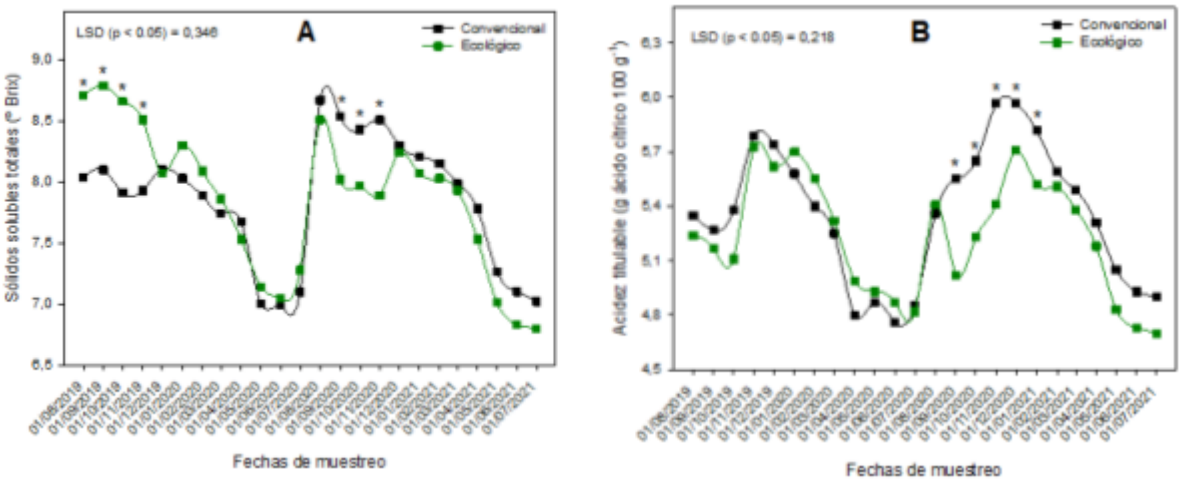


Figura 1. Representación gráfica en la variación de los sólidos solubles totales (SST) expresados como ºBrix (1A) y la acidez titulable (AT) expresada como g de ácido cítrico $100g^{-1}$ (1B) de limón ecológico y limón convencional a lo largo de las dos campañas consecutivas estudiadas; 2019-2020 y 2020-2021.

Las Figuras 1 A y 1 B muestran la evolución decreciente del contenido en sólidos solubles totales (SST) y la acidez titulable (AT) durante dos campañas de producción de zumo de limón. Durante el periodo de dos años que duró el experimento, las extracciones de zumo de limón presentaron resultados de SST y AT más elevados al inicio de campaña, disminuyendo de forma paulatina hasta el final, con independencia del sistema de cultivo empleado, convencional o ecológico (Fig. 1 A y 1 B). Este descenso en SST y AT, sobre todo los menores valores que se observan en los meses de mayo, junio y julio, puede ser debido a que la mayoría de la materia prima que se utiliza es aquella que ha estado más tiempo almacenada en condiciones refrigeradas, y esto coincide con los resultados publicados previamente, ya que en limones almacenados en condiciones refrigeradas los SST y AT disminuyen durante este periodo (Basit et al., 2019 ; Serna-Escolano et al., 2020), debido a la utilización de estos compuestos como sustratos de reserva para el mantenimiento de las funciones básicas del fruto. En el caso de los ácidos orgánicos, son utilizados durante la reacción de descarboxilación del piruvato para obtener energía (Rhodos et al., 1968; Multari et al., 2020). Además, Sun et al. (2019) publicaron el descenso en la AT durante el desarrollo del fruto en el árbol, asociada a la disminución de 3 ácidos orgánicos principalmente, ácido cítrico, ácido málico y ácido fumárico. Estos frutos no fueron sometidos a un proceso de conservación, por lo tanto el descenso en los valores de SST y AT a lo largo de la campaña, también puede relacionarse con el proceso de maduración del fruto en el árbol tal y como postuló Albertini et al. (2006). Los limones que se utilizan para la elaboración del zumo, cuando llevan su proceso de maduración en el árbol, pueden ocurrir casos tan significativos como el de la variedad Fino, ésta puede producir frutos para su comercialización o procesado en zumo desde el mes de septiembre hasta el mes de abril, por lo que es evidente que los primeros son recolectados en un estado de maduración extra temprano mientras que los que se cosechan en primavera su estado de maduración es muy avanzado. Este aspecto contrasta con el proceso de maduración de otros frutos como cerezas o uvas de mesa, en los cuales existe un aumento del contenido de sólidos solubles totales durante su desarrollo en el árbol (Serrano y Valero., 2010).

En cuanto a los zumos obtenidos de limones cultivados en fincas con el sistema convencional y otros procedentes de fincas en producción ecológica, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los SST y AT al analizar los datos estadísticamente en su conjunto. Sin embargo, al comparar los resultados con las fechas de obtención del zumo, observamos que en el ensayo desarrollado en la

campaña 19-20, las extracciones procedentes de limones ecológicos tuvieron un 8 % más de SST durante los primeros 4 meses de campaña que los convencionales. Este efecto se invirtió durante la campaña 20-21, en la cual los limones convencionales tuvieron un 8 % más de SST que los ecológicos (Fig. 1 A). En esta misma campaña 20-21 también se pudieron encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) en la AT, siendo aproximadamente un 10 % mayor en limones convencionales que ecológicos durante los primeros 5 meses de campaña 20-21, estas diferencias no se pudieron encontrar en los muestreos realizados durante la campaña 19-20 (Fig. 1 B). Dichas diferencias pueden influir en la calidad de la fruta que se recolecte durante dicho período, ya que por ejemplo, el contenido en SST se asocia con el sabor y la palatabilidad del fruto. Las diferencias entre los limones convencionales y ecológicos medidas en las campañas 19-20 y 20-21 pueden estar influenciadas por muchos factores, entre otros ambientales (temperatura, irrigación…) o varietales (Castle., 2013). Además de estas variables que no se pueden controlar, podría existir una explicación según el comportamiento del mercado de la fruta en fresco, es decir, los sólidos solubles y acidez son parámetros que disminuyen tanto durante el desarrollo fisiológico del fruto en el árbol como durante la conservación postcosecha refrigerada (Díaz et al., 2020) sobre todo en las variedad Fino que es la primera de campaña, esto nos indica que si la industria del zumo se nutre fundamentalmente de los restos de la industria en fresco, los valores obtenidos en estos parámetros pueden estar muy influenciados por el desarrollo y senescencia del limón que se utiliza como materia prima del zumo. Un mercado de fresco en el que se comercializan frutos tempranos y que no son almacenados en refrigeración antes de su manipulación, previsiblemente dará lugar a extracciones con mayor concentración de SST y AT, y por el contrario, un mercado de fresco con poco movimiento lleva consigo un retraso en las recolecciones, por lo que los frutos están más desarrollados, y además el limón suele estar más tiempo en cámara, por tanto se esperan zumos con un menor contenido en estos parámetros. Cabe destacar, que respecto a la dependencia de los mercados del fruto en fresco, los limones procedentes de producción ecológica son menos variables, ya que son clientes más selectos y reducidos, todo lo contrario del convencional, donde los cambios entre campañas son bruscos como muestran los precios de la fruta. Así, podría ser que en la campaña 19-20 la fruta que ha llegado a industria ha sido más desarrollada y conservada en producción convencional, mientras que el caso contrario ha ocurrido para la campaña 20-21.

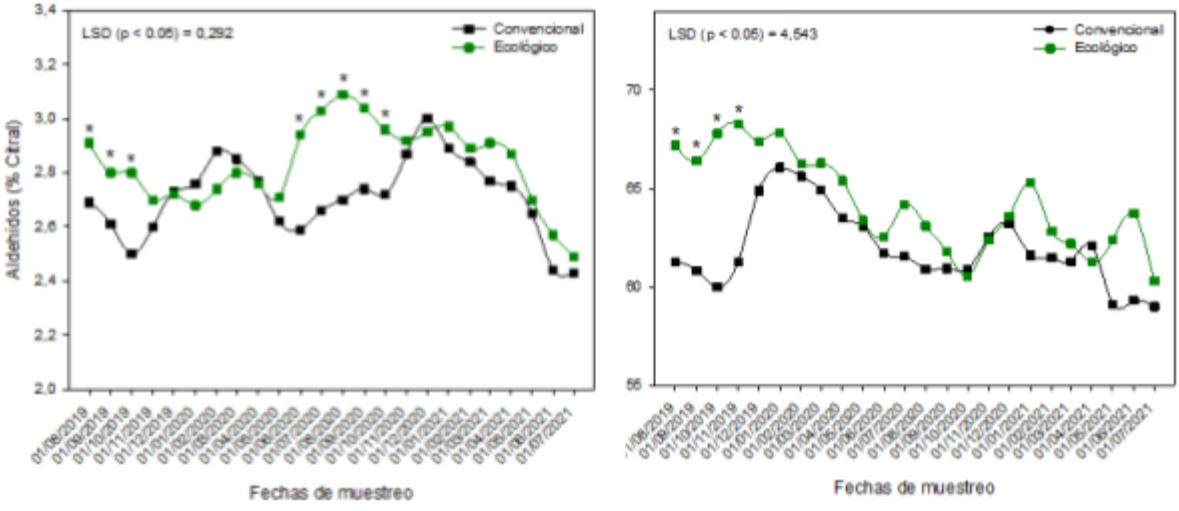


Figura 2. Representación gráfica de la variación del contenido en aldehídos (% Citral) (imagen izquierda) y valores de rotación óptica (imagen derecha) en muestras de aceite esencial de limón ecológico y convencional en las dos campañas consecutivas estudiadas: 2019-2020 y 2020-2021.

Los aceites esenciales presentes en los cítricos tienen la propiedad de desarrollar una rotación al plano de luz polarizada. Este efecto se utiliza para controlar la calidad, y se basa en la proporción de los componentes principales del aceite esencial de limón, que en este caso son el d-limoneno (dextrógiro) y el pineno (levógiro). Las variaciones en la proporción de estos dos compuestos son los principales causantes de los cambios en la rotación óptica (Stanley., 1963). Los valores que se midieron en los aceites esenciales obtenidos de los frutos convencionales estaban entre los + 58 ° y los + 66 °, en cuanto a los obtenidos de los frutos ecológicos esta media aumentó ligeramente hasta los + 60 ° y los + 68 ° (Fig. 2 A), lo que estaría dentro de la normalidad según lo publicado por Lodge et al. (1977), pero sin diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos. Sin embargo, sí que se encontraron diferencias cuando se compararon los datos de rotación óptica para el aceite esencial de cultivo convencional y ecológico para cada mes de muestreo. En este caso se observó que en la campaña 19-20 durante los 4 primeros meses el aceite del limón ecológico tuvo una rotación óptica un 10 % superior al de los limones convencionales (Fig. 2 A). Estas diferencias pudieron ser debidas entre otras causas a los sistemas de extracción empleados, ya que dichas diferencias no se observaron durante las extracciones realizadas en los limones de la campaña 20-21. Por lo tanto, no se podrían considerar como variaciones significativas asociadas a una determinada estación, para ello se requeriría de un mayor número de ensayos que reproduzcan los resultados medidos en la campaña 19-20.

El citral (formado por geranial y neral) es un componente básico del aceite esencial de limón, y tiene una influencia muy importante en su aroma. Por lo tanto, se ha utilizado como indicador de calidad, para determinar el origen geográfico del fruto e incluso en épocas en las que ha sido cosechado (Di Giacomo et al., 1994). Según el Food Chemical Codex, un aceite esencial de limón de alta calidad debería contener entre un 2,2 y un 3,8 % de aldehídos expresados como citral. En este estudio los limones convencionales tuvieron valores de 2,5 a 3,0 % y los limones ecológicos de 2,7 a 3,1 % (Fig. 2 B). En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se compararon los resultados de los frutos convencionales y ecológicos. Pero al comparar los resultados por meses, se observaron dos etapas durante el desarrollo de los frutos en las que los limones ecológicos tuvieron aproximadamente un 10 % más de citral que los limones convencionales. Esta etapa se prolongó durante 3 meses al inicio de la campaña 19-20 y durante 5 meses en el inicio de la campaña 20-21. Al igual que los parámetros analizados en el zumo, los componentes de calidad de los aceites esenciales varían más en los limones de la variedad Fino, los cuales son recolectados en los primeros meses de la campaña. Un limón de la variedad Fino se comienza a recolectar en Septiembre, y tras un proceso largo de desverdizado se comercializa o va a industria. Por el contrario, el limón de la misma variedad puede permanecer en el árbol hasta febrero, donde su proceso de desverdizado es en el árbol. Aunque harían falta estudios que nos indicaran como varían estos aceites durante el desarrollo del fruto, todo parece indicar que al igual que los SST y AT, tanto la rotación óptica como el porcentaje de citral disminuye. Las otras variedades que principalmente se cultivan en España son Eureka y Verna, pero estas se recolectan en un estado de desarrollo más avanzado en el que el desverdizado en cámara no es necesario y por tanto las variaciones en SST y AT y aceites esenciales podrían ser menores.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el contenido en componentes de calidad del zumo (SST y AT) y aceites esenciales (rotación óptica y aldehídos) del limón ponen de manifiesto diferencias en la concentración en dos campañas objeto de estudio (19-20 y 20-21). Además, el origen de la materia prima que da lugar a estos productos de la industria, convencional y ecológico, también influye en los mismos, sobre todo en el inicio de la campaña, donde los frutos utilizados son de la variedad Fino y pueden ser recolectados en un estado de maduración diferente.

Los resultados ponen de manifiesto la necesidad de seguir estudiando el efecto de las variedades y desarrollo de maduración de la materia prima para conocer su influencia en la composición química del zumo y aceites esenciales, parámetros que determinan la calidad del producto procesado.

Bibliografía

Albadalejo, Q., 1999. El Aceite Esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluacion por Organismos Internacionales. Facultad de veterinaria.

Albertini, M.V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F., Berti, L., 2006. Changes in Organic Acids and Sugars during Early Stages of Development of Acidic and Acidless Citrus Fruit. J. Agr. Food Chem. 54, 8335-8339.

Basit, A., Ayaz, S., Rab, A., Ullah, I., Shah, S.T., Ahmad, I., Ullah, I., Khalid, M.A., 2019. Effect of stevia (Stevia Rebaudiana L.,) leaf extract on the quality and shelf life of lemon (*Citrus Limon L.*). Pure Appl. Biol. 8(2), 1456-1468.

Bozzano, G., Raymo, M., Manenti, F., Rulli, C.A., Girotto, F., Piazza, L., 2021. Prompting sustainability in the citrus derivates industry: A case study. Cleaner Engineering and Technology. 4.

Castle, B., 2013. New fresh citrus varieties from the University of Florida. Citrus Industry. 94(8), 10-18.

Comparetti, A., Febo, P., Greco, C., Mammano, M.M., Orlando, S., 2016. Sicilian Potencial Biogas Production from Citrus Industry By-Product. Proceedings of 11th International AIIA (Italian Association of Agricultural Engineering). 169-173.

Díaz-Puertas, R., Díaz-Nuñez, A., Pardo-Pina, S., Serna-Escolano, V., Zapata, P.J., 2020. Estudios de los cambios fisiológicos durante la maduración de las variedades de limón ´eureka´, ´fino´ y ´verna´. CUISA 2020.

Di Giacomo, A. y Mincione, B., 1994. Gli olii essenziali agrumari in Italia. Sottoprogetto 4, monografia raisa nº3. Laruffa Editore.

EOL, 2017. Encyclopedia of life, *Citrus limon (L.)* Burm. F. [WWW Document]. *Citrus limon*: Lemon. http://eoLorg/pages/582200/overviwe. (accedido 04/04/2021).

Food Chemicals Codex. FCC. https://www.foodchemicalscodex.org/ (accedido 17 de Agosto 2021).

Gema Nieto., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., Peñalver, R., Ros, G., Viuda-Martos, M., 2021. Valorization of Citrus Co-Products: Recovery of Bioactive Compounds and Application in Meat and Meat Products. Plants, 10, 3-22.

Ladanya, M. S., 2008. Citrus Fruit Biology. Technology and Evaluation Academic Press, USA.

Lodge, N. y Wilkinson, S.A., 1977. Additional information on the physical and chemical properties of New Zealand lemon peel oil. New Zealand J. of Sci. 20 (4), 461-463.

Mamede, N. G. M. A., Corrêa de Souza Coelho, C., Freitas-Silva, O., Barboza, G. T. H., Soares, G.A., 2020. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables. Elsevier Inc (Eds.), Chapter 23. Lemon., Brazil, pp. 377-392.

Matteo, D.A., Simeone, R.D.G., Cirillo, A., Rao, A, M., Vaio, D. C., 2021. Morphological characteristics, ascorbic acid and antioxidant activity during fruit ripening of four lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) cultivars. Scientia Horticulturae, 276, 109741.

Multari, S., Licciardello, C., Caruso, M., Martens, S., 2020. Monitoring the changes in phenolic compounds and carotenoids occurring during fruit development in the tissues of four citrus fruits. Food Res. Int. 134, 109228.

Mukhim, C., Nath, A., Deka, B.C., Swer, T.L., 2015. Changes in physico-chemical properties of Assan lemon (Citrus limon Burm.) at different stages of fruit growth and development. Bioscan. 10(2), 535-537.

Pardo, J., Soler, G., Buj, A., 2016. Calendario de recolección de cítricos cultivados en España. IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias).

Redd, B. J., Hendrix, M.C., Hendrix L.D., 1986. Quality control manual for citrus processing plants, Florida.

Rhodos, M.J.C., Woodtorton, L.S.C., Gallard, T., Hulme, A.C., 1968. Metabolic changes in excised fruit tissue I. Factor affecting the development of malate descarboxylation system during the aging of disc of pre-climacteric apples. Phytochemistry. 7(9), 1439-1451.

Serrano, M., Valero, D., 2010. Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality. Spain.

Serna-Escolano, V., Martínez-Romero, D., Giménez, M.J., Serrano, M., García-Martínez, S., Valero, D., Valverde, J.M., Zapata, P.J., 2020. Enhancing antioxidant systems by preharvest treatments with methyl jasmonate and salicylic acid leads to maintain lemon quality during cold storage. Food chem 15.

Stanley, J.C., 1963. Experimental and quasi-experiment designs for research.

Sun, Y., Singh, Z., Tokala, V.Y., Heather, B., 2019. Harvest maturity stage and cold storage period influence lemon fruit quality. Sci. Hortic. 249, 232-328.

Sesión 3:

Economía Agraria y Gestión de Empresas

"Estudio a consumidores sobre la aceptación de carne de cordero trashumante"

A. Ros Almela, N. Godoy Morales y L. Martínez-Carrasco Martínez

Dpto. Economía Agroambiental. Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández. Ctra. De Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante. andrea.ros@goumh.umh.es

Resumen

La ganadería trashumante es una actividad tradicional íntimamente ligada a las zonas rurales y que se encuentra en riesgo de desaparición. En la actualidad, la carne procedente del ganado trashumante no se comercializa bajo ningún distintivo que la haga reconocible para los consumidores. En este trabajo se pretende hacer un estudio sobre la aceptación e intención de compra de carne de cordero procedente de ganadería trashumante, con el fin de detectar segmentos potenciales de consumidores y proponer estrategias para la comercialización de este producto. Ello redundaría en un beneficio para los ganaderos que podrían obtener un valor añadido de su producto. Para ello se llevó a cabo un estudio exploratorio a consumidores mediante una encuesta on-line distribuida a través de redes sociales. Se detectaron dos segmentos denominados `Activos´ y `No Activos´ en función de las aptitudes medioambientales.

Palabras clave: carne, cordero, trashumancia, certificación, calidad, conductas medioambientales.

"Study of consumers on the acceptance of transhumant lamb meat"

Abstract

Transhumant cattle ranching is a traditional activity closely linked to rural areas and which is at risk of disappearance. Currently, meat from transhumant cattle is not marketed under any label that makes it recognizable to consumers. This work aims to carry out a study on the acceptance and purchase intention of lamb meat from transhumant livestock, in order to detect potential consumer segments and propose strategies for the commercialization of this product. This would result in a benefit for farmers who could obtain added value from their product. For this, an exploratory study of consumers was carried out through an online survey distributed through social networks. Two segments called 'Active' and 'Non-Active' were detected based on environmental skills.

Keywords: meat, lamb, transhumance, certificate, quality

Introducción

La trashumancia proviene del latín `trans´, que significa `de otra parte` y `humus´ que quiere decir `tierra.

El término trashumancia se define como un tipo de explotación extensiva que implica el desplazamiento de ganado conducido por una persona en busca de pastos frescos en las montañas durante los meses de verano y de temperaturas más suaves en las comarcas del sur en invierno (UPA, 2009). Este movimiento de migración ha sido fruto de unas diferencias climáticas con marcada estacionalidad y previsibles y una orografía compleja (Oteros-Rozas, 2013)

La trashumancia es una forma de pastoreo nómada (Oteros-Rozas, 2013) pero se distingue del nomadismo por el hecho de que la población humana (familia o grupo de familias) no se desplaza junto con los animales. (UPA, 2009).

Los desplazamientos de ganado en España se dan a través de una amplia Red de Vías Pecuarias distribuidas a lo largo de toda la geografía. Cuentan con unos 125.000 km de longitud y 400.000 hectáreas de superficie abarcando alrededor del 0,83% de la superficie nacional. (Oteros-Rozas, 2013; UPA, 2009)

La trashumancia presenta una serie de ventajas y beneficios como promover el desarrollo rural, establecer una red socio-ecológica sostenible y resiliente, aprovechar subproductos y abono natural, prevenir los incendios, aumento de la calidad y bienestar animal y favorecer el turismo de trashumancia (UPA, 2009; Otero-Rozas, 2013; Amat-Montesinos et al., 2018; Burgos, 2007).

A pesar de las numerosas ventajas que tiene, la trashumancia en España se enfrenta hoy en día a graves problemas como la edad avanzada de la población pastoril, dificultad de relevo generacional, costes elevados de desplazamientos, amenaza a vías pecuarias por urbanizaciones y unas exigencias distintas según Comunidades autónomas (UPA, 2009; Baena y Casas, 2010)

La justificación de este trabajo fue motivada por diversos motivos como:

- Contribuir al mantenimiento de la actividad trashumante que está en riesgo de desaparición.
- Posible beneficio económico a ganaderos con este sistema de producción por el valor añadido que poseen mediante distintivos que permitan al consumidor reconocer esta carne.
- Falta de estudios e investigación previa que analice las actitudes de los consumidores hacia los productos derivados de la ganadería trashumante o la disposición a pagar un sobreprecio por ellos.

El objetivo general es analizar la aceptación entre los consumidores de carne de cordero procedente de ganadería trashumante y explorar el interés en un certificado o distintivo de calidad

Metodología.

En este trabajo se han utilizado fuentes secundarias para establecer el marco teórico de la investigación y luego, se ha optado por la realización de un estudio exploratorio a consumidores mediante una encuesta on-line (fuente primaria) distribuida a través de redes sociales.

La encuesta se diseñó utilizando la herramienta Google Forms y en ella se incluyeron preguntas sobre hábitos de consumo y compra de carne de cordero, conocimiento de trashumancia, aceptación del producto objeto de estudio (carne de cordero procedente de ganadería trashumante), actitudes hacia una hipotética certificación de origen trashumante, conductas medioambientales medidas a través del Ecobarómetro (Pérez-Díaz y Rodríguez, 2016) y perfil sociodemográfico

La recogida de datos se realizó de forma on-line entre el 9 y el 21 de enero de 2021. La encuesta se distribuyó a través de redes sociales como WhatsApp, Facebook e Instagram. La población objetivo eran consumidores de carne de cordero, por lo que se incluyeron dos preguntas filtro: una para determinar si se era o no consumidores de carne, descartando a todos aquellos que no lo eran y otra para determinar si se era o no consumidores de carne de cordero.

Para el análisis de datos se llevó a cabo un análisis univariante (cálculo de medidas centrales y de dispersión para las variables de escala y distribución de frecuencias para las variables nominales).

Para realizar la segmentación se llevó a cabo un clúster de K medias a partir de las conductas medioambientales realizadas por la muestra. Para el análisis de estos datos se utilizó el software JAMOVI.

Para buscar diferencias entre los segmentos se realizaron tablas cruzadas y ANOVAs teniendo en cuenta los niveles de significación de un 0,05 y de 0,1.

Resultados y Discusión

Se han registrado un total de 508 respuestas, de las cuales descartamos 247 por diversas razones como las de aquellos consumidores que no consumen carne de ningún tipo (31 respuestas) o quienes no consumían carne de cordero (200 respuestas) y por otros motivos como el lugar de residencia fuera de España o respuestas incoherentes (16 respuestas).

En total resultaron 261 respuestas válidas, un poco más de la mitad del total de respuestas.

Las características del perfil sociodemográfico de la muestra fueron las siguientes: sexo y edad equilibrados, las familias más comunes tenían entre 2,3 y 4 miembros, la mayoría de los encuestados poseían estudios universitarios finalizados y tienen las siguientes rentas: <1000€ (5,4%), 1000-1999 € (23,1%), 2000-3499 € (29,6%), 3500-4999 € (20%), >5000€ (6,2%) y un 15,8% prefirieron no contestar. No se dedicaban a la actividad agraria o ganadera, sí que realizan la compra habitualmente y su lugar de residencia fue principalmente en el Sur de España (63,1%) seguido del centro (23,5%) y Norte (13,1%).

En cuanto a los hábitos de compra y consumo de carne se puede decir que lo más habitual es un consumo de 1-2 veces al mes, el lugar habitual de compra es el supermercado, hipermercado o carnicería de barrio. La mayoría de los encuestados no compran carne con denominación de origen ni ecológica, y lo que mejor valoran a la hora de comprar carne es el sabor y el aspecto global del producto.

Respeto al conocimiento sobre trashumancia puede afirmar que si conocen el término trashumancia y acertaron la definición correcta, aunque la media de nivel de conocimiento subjetivo fue 10,9 en una escala de 4 a 20.

Con respecto a la aceptación de carne de origen trashumante, la intención de compra por 25€/kg fue de 7,4 en una escala de 1 (seguro que no lo compraría) a 10 (seguro que lo compraría), y su disposición a pagar media fue de 23 €/kg.

De poseer un certificado de calidad se puede decir que se asocian los siguientes atributos (en una escala de 1 a 5): ayuda a fomentar productos nacionales (4,28), ayuda a promover trabajo de la zona (4,2), asegura el origen (4,17), tendría mejor calidad (4,06), da seguridad (4,02) y tendría mejor sabor y textura (3,96).

Por último, en cuanto a las conductas medioambientales más difundidas, serían: usar bombillas de bajo consumo, separar la basura doméstica, poner en práctica medidas para ahorrar agua en el hogar y priorizar el medioambiente frente al aumento del nivel de vida

Segmentación

Se realizó una segmentación según las conductas medioambientales, clasificando a los encuestados en dos grupos:

El segmento 1, denominado 'Activos', representa el 57% de la muestra y son aquellos que tienen un nivel de acuerdo alto o muy alto con las siguientes conductas medioambientales: separan la basura, ahorran agua en su hogar, usan bombillas de bajo consumo y utilizan el transporte público. Tienen un nivel de acuerdo medio con "dejar de utilizar el vehículo particular por razones medioambientales" y la compra de productos ecológicos.

El segmento 2, denominado "no activos" representan el 43% restante y se caracterizan por tener un nivel de acuerdo medio o medio-bajo con todas las conductas propuestas, salvo el uso de bombillas de bajo consumo que está más generalizado

No se han encontrado diferencias significativas entre los dos segmentos en el número de miembros que componen el hogar, el nivel de renta o si se dedican profesionalmente a la agricultura o ganadería con el otro grupo.

En el segmento "Activos" destacan los mayores de 35 años y muy especialmente los que tienen entre 50 y 64 años que representan un 36% del segmento frente al 29,1% que representa este grupo en la media muestral. Con respecto al nivel de estudios, destacan los que tienen un nivel de estudios universitarios finalizados (75,3% frente al 71,3% de la media). Hay más consumidores en este segmento que realizan la compra de manera habitual (84,0%).

En cuanto al área geográfica la mayoría de encuestados son del sur de España (55%) pero representan un porcentaje menor que la media muestral (63,1%), en cambio los encuestados con residencia en el norte y centro del país sí destacan de la media total.

Con respecto a los hábitos de consumo de carne, la frecuencia de consumo en general es baja, menos de una vez al mes (45,1% del segmento) o 1-2 veces al mes, siendo el primer segmento superior a la media total. A pesar de que estos consumidores compran en menor medida carne en supermercados/hipermercados y más en carnicerías de barrio que el segmento 2, estas diferencias no han resultados significativas desde el punto de vista estadístico.

En cuanto a los atributos de importancia en la compra de carne destacan, el sabor (4,5) el aspecto global del producto (4,3), el contenido en grasa (3,7), el valor nutricional (3,5), tipo de carne (3,6), que sea ecológico (3,1), y que tenga una vida útil larga (3,1) como los mejores valorados con una puntuación superior a la media.

Este grupo presentó un elevado grado de conocimiento del término trashumancia con un 82,7% que afirmaban conocerlo, esto se vio corroborado en la siguiente pregunta en la cual debían elegir la definición correcta de trashumancia, ya que acertó más de un 90% y también por el grado subjetivo de conocimiento de trashumancia que ha dado una puntuación media de 11,4 en una escala de 4 a 20, siendo superior a la media total de un 10,9.

En el caso hipotético de que se creara una certificación de calidad, dicha certificación proporcionaría al este segmento 1 mayor seguridad, y les garantizaría que la carne es de mejor calidad, mejor sabor y textura, se asegurarían que la carne es de esa zona promoviendo así el trabajo en ella y fomentaría los productos nacionales. Todos estos atributos fueron valorados con una media superior a la total.

La intención de compra de carne de cordero de origen trashumante presentó diferencias significativas siendo mayor en este segmento con una puntuación de 7,7 (en una escala de 1 a 10) frente a 7,4 de media. Por último, decir que en la disposición a pagar no se encontraron diferencias significativas siendo el precio medio obtenido de 23 €/kg

El segundo segmento denominado 'No activos' Presentan en general una edad menor que el segmento "Activos", destacando los grupos entre 18-24 años (25,2%) y entre 25-34 años (32,4 %) con porcentajes superiores a la media muestral (18,8% y 25,7 % respectivamente).

Por otro lado, destaca un nivel de estudios secundarios (12,6 %) o universitarios en curso (19,8 %) con porcentajes superiores a la media (10,3% y 14,9 % respectivamente).

Este grupo, a tiene un porcentaje de casi un 30% que no realiza la compra habitualmente frente a un 21,8% de la media total.

Su lugar de residencia es mayoritariamente el sur de España con un valor de 73,9% superior a un 63,1% del total, al igual que el grupo 1.

Destaca en este grupo una mayor frecuencia de consumo de carne de cordero con 1-2 veces al mes con un 50% frente al 45,2% de la media, y el consumo de 1-2 veces por semana (18,9% superior a la media total de un 15,7%). También hay un 2,8% de consumidores que consumen cordero 3 veces a la semana o más, mientras que en el segmento 1 no había ningún encuestado con estas características. En definitiva, estamos ante un grupo de consumidores con mayores frecuencias de consumo de cordero.

En cuanto a los atributos de importancia en la compra de carne lo más importante para este segmento es el sabor (4,2) y el aspecto global del producto (4,1) aunque no le dan tanta importancia como el segmento 1. El resto de atributos son puntuados con importancias próximas a 3 e inferiores a la media total.

En este grupo hay menos consumidores que conocen el término trashumancia en comparación con la media (69,4% frente al 77%) y destaca un 21,6% que afirman no conocerlo. Cuando se preguntó por la definición correcta se vio que una amplia mayoría (81,6%) acertó, aunque en un menor porcentaje a la media (88,1%). Este grupo obtuvo de media un 10 en cuanto a nivel de conocimiento subjetivo, menor que la media que fue de un 10,9.

En cuanto a la certificación de calidad este grupo también lo relacionaría positivamente con la seguridad, procedencia de la carne, promover el trabajo de la zona o fomentar productos nacionales, aunque en menor medida que el grupo de los 'Activos'. Finalmente, este grupo presenta una menor intención de compra de carne de cordero de origen trashumante con una puntuación de un 7, menor que la media total con un 7,4. Su disposición a pagar media por esta carne es de 23,2 €/kg, similar a la media.

Discusión

Podemos relacionar en líneas generales nuestra segmentación con la de Vanhonacker et al. (2013) que fue igualmente por aptitudes medioambientales (huella ecológica), aunque en su investigación clasificó 5 segmentos, entre los cuales se incluyen los activos y no activos (el resto eran segmentos con características intermedias). Vemos como coinciden en los resultados que los activos estaban dispuestos a pagar más por opciones más sostenibles y que los no activos tienen un consumo mayor de carne. Este hecho puede ser debido a una menor conciencia medioambiental.

Tal y como se vio en el estudio de Dimara y Skuras, (2003) la certificación, o el origen, son atributos de calidad que son percibidos por el consumidor como `seguros´ o productos sanos´; este hecho queda plasmado sobre todo en el grupo denominado `Activos´. También mencionar el estudio de Sanjuan et al. (2001) donde se analizaron los atributos que consideraban los consumidores a la hora de realizar la compra de carne de cordero con marcas diferenciadoras en el que se vio una relación positiva con la seguridad alimentaria y una predisposición a pagar más debido a que el atributo precio no fue valorado.

En el estudio de Li et al. (2016) analizaron la disposición a pagar por ternera producida bajo condiciones que redujesen la emisión de gases de efecto invernadero y vieron que los consumidores dispuestos a pagar tienen rentas más altas y están más preocupados por el medio ambiente. En nuestro estudio, en cambio, no se ha visto diferencias significativas entre grupos en función del nivel de renta, pero sí una intención de compra mayor en los `Activos´.

En cuanto a la edad, que sí presento diferencias significativas, el estudio de Bernués et al. (2012) concluye que la edad puede ser un condicionante que influye sobre la disposición a pagar carne con certificado de calidad. En nuestro estudio los que mayor disposición a pagar tendrían están comprendidos entre unas edades de 35-64 años. Gracia y De-Magistris (2013) también relacionan la edad y la disposición a pagar y encuentran un segmento compuesto por personas menores de 41 años con menor disposición a pagar un precio mayor. Este segmento podría ser, en nuestro estudio, el denominado `No Activos´ ya que tienen menor intención de compra y está formado por gente de menor edad.

En el estudio de Bernabéu et al. (2018) se vio que los consumidores habituales basan sus preferencias principalmente en el origen y los ocasionales valoran otros atributos como la IGP o la producción ecológica, profundizando más en este fenómeno se observó como la IGP influye más significativamente que la producción ecológica. En este estudio vemos como los `Activos´ que serían los que menos consumen carne valoran más el certificado de ecológico que los `No Activos´.

En cuanto a atributos intrínsecos de la carne de cordero el estudio de Bernabèu y Tendero (2004) pone de manifiesto que los mejor valorados por los consumidores tradicionales fueron el aspecto fresco y color claro de la carne y que no aparecieron diferencias significativas en la importancia del contenido de grasa y en el tipo de animal. En nuestro estudio se ha observado como el contenido en grasa sí tuvo diferencias entre ambos segmentos, siendo de mayor importancia para el segmento `Activos´ pero a diferencia del anterior estudio, el tipo de animal también presentó estas diferencias lo cual se ve apoyado con diferencias significativas en el tipo de carne (roja/blanca). El aspecto global, que fue uno de los atributos mejor valorado dando diferencias significativas entre los dos grupos lo podemos comparar con el aspecto fresco mencionado en el estudio de Bernabèu y Tendero (2004) en el cual, como se ha dicho antes, también se observaron estas diferencias.

Conclusiones

Se puede decir que la intención de compra mayor en los ‘Activos’ puede ser debida a todas las ventajas que proporciona el certificado de calidad al producto son más valoradas por este segmento. Tal como se vio en el estudio realizado por Gracia (2005) sobre comportamiento del consumidor en la compra de carne de cordero con IGP, esta denominación ayuda positivamente en la decisión de compra y contribuye a captar la atención de potenciales consumidores.

La estrategia principal es dar a conocer los beneficios nutritivos de la carne de ovino, la cual permitirá que esta carne sea más demandada, ya que en general su consumo es bajo.

Se trata de integrar en la certificación trashumante tanto atributos extrínsecos, como el origen, la seguridad, la ayuda al desarrollo económico de la zona de origen o el mantenimiento del paisaje, como los intrínsecos como el sabor, el aspecto global y su valor nutricional.

Como los aspectos intrínsecos no se pueden confirmar hasta que son probados, la certificación estaría enfocada en darle la garantía a los consumidores de que cumple lo que promete. No obstante, se podrían hacer campañas de catas o muestras donde se diera a conocer el producto al consumidor.

En cuanto al origen, aparte de indicar el lugar donde se ha producido, sería más interesante vincular la carne de cordero con certificación trashumante a los pastos y al mantenimiento del paisaje. Sería algo como da igual la procedencia, lo importante es su aportación al medioambiente. Aunque también sería

necesario indicar el origen para que el consumidor pueda relacionar en qué zona está aportando su granito de arena para contribuir con la causa.

Sería conveniente también darle a este certificado un enfoque de control de calidad en el que se garantice determinados estándares en el sistema de producción y trazabilidad (que cada pastor no haga lo que quiera).

Por último, hay que considerar el carácter prospectivo y limitado de los resultados obtenidos. En el caso de un lanzamiento real de la carne de cordero trashumante habría que realizar estudios más amplios, como una investigación de mercados o un test de mercado

Bibliografía

Amat-Montesinos, X., Cortés Samper, C. & Larrosa Rocamora, J.A. (2018). Patrimonio territorial y paisajístico de la trashumancia en España. retos hacia un turismo sostenible y responsable. I Congreso Internacional Turismo transversal y Paisaje, Actas.

Baena, P. M., & Casas, R. (2010). Past, present and future of transhumancia in Spain: Nomadism in a developed country. Pastoralism: Research, Policy and Practice, 1(1), 72-90.

Bernabéu, R., & Tendero, A. (2004). Diferencias en las preferencias de los consumidores de carne de cordero. Distribución y consumo, 73, 101-107.

Bernabéu, R., Rabadán, A., El Orche, NE y Díaz, M. (2018). Influencia de las etiquetas de calidad en la formación de preferencias de los consumidores de carne de cordero. Un estudio de caso español. Ciencia de la carne, 135, 129-133.

Bernués, A., Ripoll, G., & Panea, B. (2012). Consumer segmentation based on convenience orientation and attitudes towards quality attributes of lamb meat. Food Quality and Preference, 26(2), 211-220.

Burgos, F. J. A. (2007). Trashumancia y turismo en España. Cuadernos de turismo, (20), 27-54.

Dimara, E., & Skuras, D. (2003). Consumer evaluations of product certification, geographic association and traceability in Greece. European journal of marketing.

Gracia, A. (2005). Comportamiento del consumidor en la compra de carne de cordero con IGP-Ternasco de Aragón (No. 1102-2016-91054, pp. 137-161).

Gracia, A., & de-Magistris, T. (2013). Preferences for lamb meat: A choice experiment for Spanish consumers. Meat science, 95(2), 396-402.

Li, X., Jensen, K. L., Clark, C. D., & Lambert, D. M. (2016). Consumer willingness to pay for beef grown using climate friendly production practices. Food Policy, 64, 93-106

Oteros-Rozas, E. (2013). Análisis de una práctica agraria tradicional en la cuenca mediterránea desde la perspectiva socio-ecológica: la trashumancia en la Cañada Real Conquense. Tesis doctoral inédita.

Pérez-Díaz, V. y Rodríguez, JC. (2016), Ecobarómetro Fundación Endesa. Cultura ecológica y educación. (74 y 77) Disponible en: https://www.fundacionendesa.org/content/dam/endesa-fundacion/medio-ambiente/educacion-ambiental-innovacion-ecologica/ecobarometro_cultura_ecologica_y_educacion_fundacion_endesa.pdf

Sanjuan, A. I., García, M. S., & Akl, G. (2001). El distintivo de calidad como indicador de seguridad alimenticia en carne de vacuno y cordero. Economía Agraria y Recursos Naturales, (1), 77-94.

Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Ecología. Fecha de lectura: 13-06-2013

UPA (2009). La trashumancia en España. La Tierra 213, 49-51 (Disponible en: https://www.upa.es/_la_tierra/la_tierra_213/pag_049-056_agriymamtrashumancia.pdf).

Vanhonacker, F., Van Loo, E. J., Gellynck, X., & Verbeke, W. (2013). Flemish consumer attitudes towards more sustainable food choices. Appetite, 62, 7-16.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Breeding and Processing Company in Aranda de Duero (Burgos).

P. Saiz Valle[1], I. Blanco-Gutiérrez[2,3], L. Luna[4]

[1] ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid. Av. Puerta de Hierro, nº 2-4, 28040 Madrid. p.saizv@alumnos.upm.es
[2] Departamento de Economía Agraria, Estadística y Gestión de Empresas, ETSIAAB, UPM. Av. Puerta de Hierro, nº 2-4, 28040 Madrid. irene.blanco@upm.es
[3] CEGRAM, UPM. Paseo Senda del Rey, 13, 28040, Madrid.
[4] Departamento de Ingeniería Agroforestal. ETSIAAB, UPM. Av. Puerta de Hierro, nº 2-4, 28040 Madrid. luis.luna@upm.es

Resumen

En la primera parte del proyecto se realiza una investigación previa en la que se detallaran las características más importantes del mercado de la alimentación animal en general y del mercado de la producción de insectos en concreto. Esta investigación incluye las características agronómicas, biológicas y nutricionales más relevantes de *Hermetia illucens* (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae: Hermetiinae). *Hermetia illucens* ha sido propuesta por la FAO como alimento de futuro en el informe sobre insectos comestibles de 2013 ya que, con un alto contenido de proteínas y grasas, podrían convertirse en el principal ingrediente de los futuros piensos para animales y alimentación humana. La segunda parte abarca la construcción de las instalaciones donde se lleva a cabo la cría y procesado de la Mosca Soldado Negra. Después de estimar los flujos de caja anuales de la granja de insectos, se evalúa la rentabilidad de la inversión. Por último, se analizan los resultados con el fin de destacar los hallazgos más relevantes y determinar los beneficios económicos y agronómicos de la creación de una empresa de proteínas de insectos en España.
Palabras clave: *Hermetia illucens*, insectos comestibles, alimentación animal.

Abstract

The first part of the project consists of a previous research where the most important characteristics of the animal feed market and insect feed market are detailed. This research includes relevant agronomic, biological, and nutritional characteristics of the Hermetia ilucens (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae: Hermetiinae). Hermetia illucens, black fly soldier, is one of the most promising species as an edible insect for food and feed. It has been chosen as one of the edible insects proposed by FAO for the edible insect report 2013. High in protein and fat, they could make them turn into a main ingredient in future animal feeds. The second part is devoted to the construction of the facilities where de breeding and processing of the Black Soldier Fly take place. After estimating the insect farm annual cash flows, the profitability of investment is evaluated. Lastly, results areanalyzed in order to highlight the most relevant findings and to the determinate the economic and agronomical benefits of setting up a company of insect protein in Spain.
Keywords: Hermetia illucens, edible insects, animal feed.

Objectives

The purpose of this project is to evaluate the feasibility of insect feed in Spain and, at the same time, to determine the economic and agricultural benefits that could boost such an expansion through the establishment of a breeding and processing plant for black soldier flies. The final aim is to obtain a higher economic yield by producing a more profitable product, respecting the environment, and taking advantage of the resources that nearby productions discard, like for example leftovers from vineyards or orchards.

Situation

The company's building is located on the outskirts of the city of Aranda de Duero, in the industrial park of Prado Marina in the province of Burgos (Castilla y León, Spain), with coordinates: Latitude 441.050, longitude 4.611.650 in the UTM zone 30.

Content

Exponential growth in world population is the main reason for the increase in agricultural and livestock production and soil overexploitation. By 2050 the world's population is expected to exceed 9 billion people, which means that food production will have to increase by more than 70% to feed the entire population (FAO).

Nowadays, forty percent of the earth’s surface is dedicated to crops and animal production, considering that the largest regions are deserts and urban areas, and that majority of the most fertile lands are already destined for different crops we can say that we have turned our planet into a big farm.

The agricultural activities of today with the expansion and intensification of crops do compromise the ecosystems of tomorrow, this means that we need to find new ways of growing food. In view of these circumstances and to satisfy the growing population and food and animal feed demand, new research is being pushed into the development of new protein sources. Besides, it is becoming more and more evident the need for a gradual transition into more efficient and sustainable agriculture and livestock.

The world market share in compound feed production has passed the threshold of 1 billion metric tons for the third consecutive year since 2016, with an average of $400 billion in annual revenues. This sector directly employs more than 25 million people worldwide, from farmers, technicians, scientists to entrepreneurs (IFIF, 2020). Livestock, the main component in feed manufacturing, plays a key role in securing animal protein supplies and contributes about 40 percent to the global value of agricultural production, supporting the livelihoods and food security of nearly 1.3 billion people worldwide (FAO, 2020).

Insects are an alternative food source that can offer a cheap and efficient opportunity to counter nutritional insecurity by providing additional food and feed. Their highly nutritious composition and economical accessibility makes them the best alternative to the traditional compound feed.

The market share of insect meal in protein feed is currently approximately 1%, being the aquaculture sector the one consuming more than 50% of the total European insect protein production.

The final destination of insect mass production is animal feed, however, its uses also extend to other areas of the agri-food sector such as fertilisers and pesticides, as well as uses outside the agri-food industry in sectors such as cosmetics and healthcare.

The main target of companies in the sector is to take the existing production output to a higher industrial level, in order to increase their profits. To this end, they are partnering with manufacturing companies in the sector who provide the equipment and machinery for large-scale production.

However, to date, production processes are restricted, owned by the few companies in the sector, which makes it impossible to standardise these processes, but at the same time drives different lines of research.

The driving forces behind this type of business are the easy maintenance and acquisition of raw materials for insect rearing and production and society's desire to improve its eating habits through the search for more environmentally sustainable solutions. On the other hand, the most important barriers to mass production of insects are a very competitive, traditional and mature livestock sector with excellent commercial relations with traditional feed suppliers, also remains a low level of consumer acceptance.

Results and Discussion

Alternative selection

Some of the different insects can be used for the production of animal feed according to the legislation in force COMMISSION REGULATION (EU) 2017/893 of 24 May 2017 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Annexes X, XIV and XV to Commission Regulation (EU) No 142/2011 as regards the provisions on processed animal protein were examined during the process of this project: *Tenebrio molitor, Hermetia illucens* and *Acheta domesticus*.

When comparing the nutritional values of all the alternatives, although *H. illucens* is the one that has the best relationship in terms of percentage of dry matter (91.3% as fed) and contribution of raw protein (42.1 % Dry matter), the cricket provides more raw protein (63.3 % Dry matter) but its percentage of dry matter is much lower than that of *T. molitor* and *H. illucens* with only 28.4 % of Dry matter as fed . The mineral composition of *H. illucens* presents much higher values than *A. domesticus* and *T. molitor*. In terms of fatty acid content, the closest is *A. domesticus*, which makes sense as it also has the highest percentage of crude protein. The feeding of *H. illucens* opens up a range of possibilities and resources, as it does not require as much water and dry matter as *A. domesticus* and *T. molitor*.

The life cycle of Black soldier fly is one and a half months, which means that the non-productive period is drastically reduced if compared with the other alternatives. Furthermore, in this case, and due to the layout of the adult and fattening rooms, it would be possible to overlap productive periods, reducing the non-productive period as much as possible and maximising annual production.

After the analysis, of the life cycle, low susceptibility to disease or parasitism, low cost of food, safety, nutritional quality, ease of storage and commercial viability, *Hermetia illucens* (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae: Hermetiinae), was selected as the best option for the production of animal feed.

Construction works

Before the installation of the prefabricated building, the 7,372 m^2 of the plot will be cleared and cleaned by mechanical means. The construction of the building will be entrusted to a company specialised in the manufacture and construction of customised prefabricated modular buildings.

The building is a symmetrical gabled bay with a 30.5 m span. The height of the pillars is 5.0 m and at the ridge the height is 6.5 m, so the slope of the roof is 10% (5.7º). In total there will be 13 porticoes with a separation of 5 m, generating 12 openings and therefore a closed building with a floor area of 30.45 x 60.40 m^2.

The electrical installation will consist of one main panel set in the offices from which three secondary panels will be derived to supply the other rooms, with higher consumption.

Calculations for each circuit are detailed in table 1, in accordance with the requirements of the Low Voltage Regulation.

The arrangement of every line has been made considering the supply guarantees of the installation, with all those that require a high guarantee of supply enjoying independence.

Table 1. Electrical installation. Source: Own elaboration.

	Nominal voltage	**Active power (W)**	**Reactive power (Var)**	**Length (m)**	**Nominal current (A)**	**Cable section (mm^2)**	**I max (A)**
Secondary panel I	400.00	8,453.60	27.46	18.00	12.20	4.00	35.92
Secondary panel II	400.00	47,644.60	21,233.08	24.00	75.29	25.00	93.09
Secondary panel III	400.00	40,292,00	39,213.11	2.00	81.15	35.00	115.81
Distribution board	400.00	47,613,90	60,492.17	15.00	112.12	50.00	140.74

Protection against direct and non-direct contacts by means of differential switches and by means of magneto-thermal circuit breakers protection against overloads.

- For the distribution board, a differential relay with a thyroid core has been used
- For the magneto-thermal switchers, curve C was selected for lights and power suppliers with 16 and 25 A of and curve D for the machinery with 16, 25 A ,50 A, 63 A, 100 A, 125 A
- For the magneto-thermal switchers, curve C was selected for lights and power suppliers with 16 and 25 A of and curve D for the machinery with 16, 25 A ,50 A, 63 A, 100 A, 125 A
- For the channeling, a grid tray of different sizes, 60x60 cm, 150x600 cm or 150x400cm will be used, depending on the number of cables it carries
- Following the ITC-BT-18, the installation of the earthing system has been designed.
- Two Cu-coated steel picks 2 m long and 14 mm in diameter, separated by a distance of 4 m

Production process

Processing of black soldier flies for animal feed or natural fertilizers is a complex industrial process in which several physical treatments follow each other until the result is obtained.

Before starting production, all facilities and material to be used during the process must be cleaned and disinfected. Once all the equipment has been disinfected, the technicians in charge should prepare the adult rearing and fattening rooms to make the whole process as smooth as possible.

During the substrate preparation, the first step is to remove unwanted substances from the substrate (wheat bran, Dried Distiller's Grain (DDGS) and organic waste from nearby orchards). The final purpose of this phase is to achieve a homogeneous and quality substrate following the hygiene rules established in the EC 1774/2002 and EC 1069/2009 laws.

Literature is diverse regarding the amount of substrate needed to feed black soldier flies in their larval stage, a value of approximately 14 kg/m^2 has been taken, for a total of 2.5 kg of substrate per tray. During the 15-day larval phase, substrate should be administered every 3 days, for a total of 5 times per cycle. Bearing in mind that there are 4,760 trays, in total approximately 59,500 kg of substrate will be needed per cycle.

Once the initial colony has been established and the adult females of black soldier flies have oviposited, all the offspring will be moved to the fattening room. Approximately 6-8 days should be counted from the moment the last imago has emerged to remove the cardboard sheets with the offspring.

A constant temperature of 27±1 ºC, relative humidity between 60 and 70%, a regime of 14 hours of light and 10 hours of darkness and constant ventilation will be maintained throughout the breeding process.

Figure 1 shows a scheme of the production process that will be carried out in the facilities.

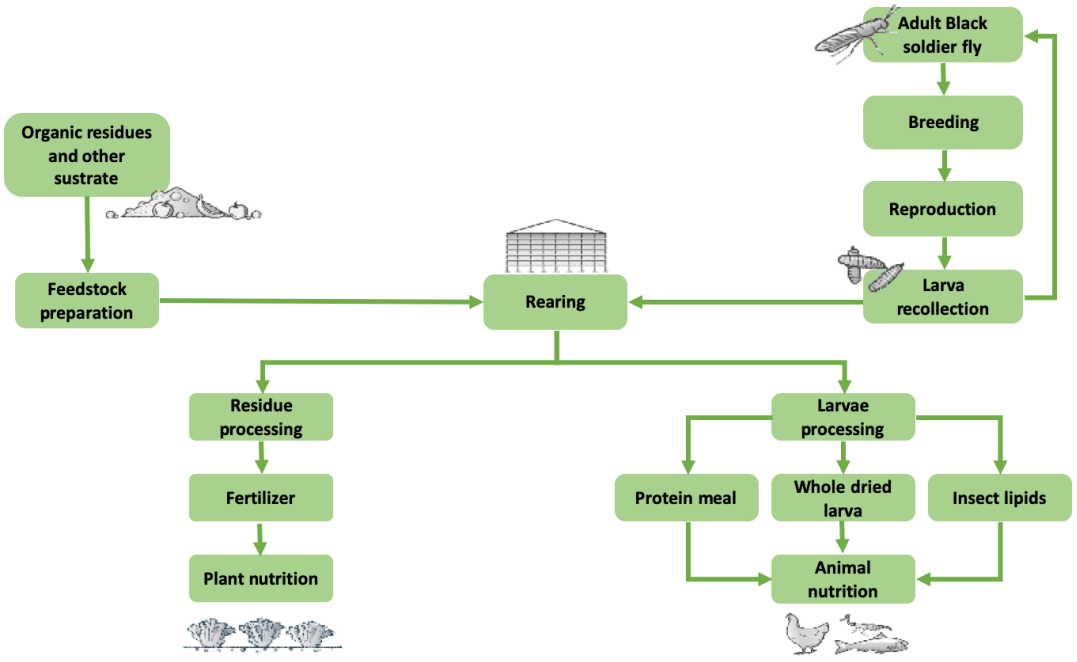


Figure 1. Production process scheme. Source: Bühler Holding AG.(2019).

Below in figure 2, the general production schedule, starting from the emergence of the first adults. This is an indicative calendar, by days, assuming that the first adult male emerged on the first day of the month.

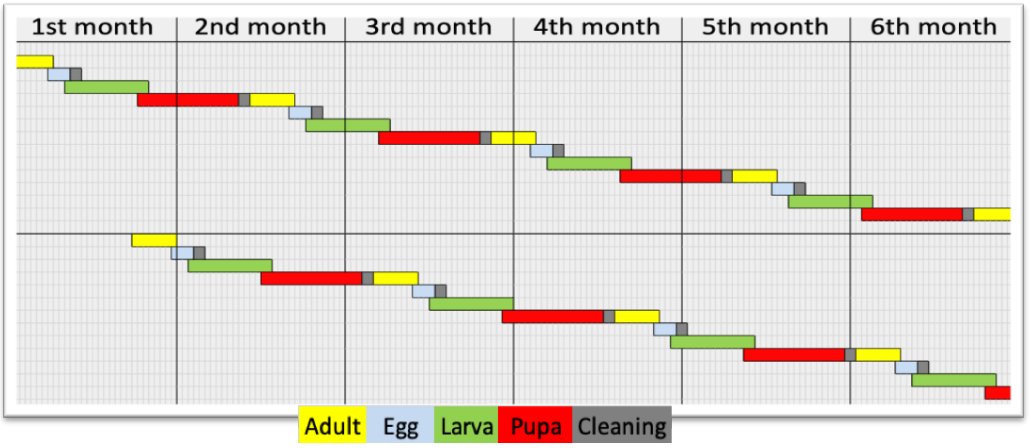


Figure 2. Production Schedule proposal for mass rearing of H. illucens. Source: Own elaboration.

Table 2 shows the technical specifications and a brief description of each process.

Table 2. Technical specifications of each process. Source: Own elaboration.

Process	Machinery	Size/capacity	Description
Substrate storage	**Silos/containers**	Min 100 m^3	Raw material sources that meet nutritional and safety requirements arrive at the facility and are stored in silos before they are transported to the substrate processing room.
Substrate preparation	**Washing cabinet**	2.1 x 2.6 x 3.3 m	Prior to the start of production activity, it is ensured that all instruments used are disinfected and ready for use.
	Vertical Schredder	2.5 x 2 x 2 m	Access to nutrients is easier for the larvae if the substrate comes in small portions or even in liquid or paste form. Some organic waste should be shredded to reduce the size of the particles to achieve a more efficient mixing of the different sources.
	Rotary drum blancher	2.5 x 3 x 1.5 m	Ensuring that raw material sources are free of pathogens and other contaminants is a key step in achieving good larval feeding.
	Vertical mixer	2.5 x 4 x 1.8 m	Dry and wet raw material sources are mixed in order to achieve the most nutritious and tasty food for the larvae.
Adult rearing	**Cages**	0.6 x 0.6 x 0.9 m	The black soldier fly will spend its adult phase here, where they will mate, and females will oviposit in trays with prepared cardboard sheets
Larva growth and fattening	**Trolleys**	1.5 x 0.7 x 1.80 m	It facilitates the storage of the larvae during the fattening process.

	Fattening trays	0.3 x 0.60 x 0.30 m	The larvae will feed and grow until they are ready to go to the processing area.
Larva processing	**Sieve machine**	1.5 x 1.5 x 1.5 m	After this step, the final product will have the correct particle size and is ready to be moved to the next stage of processing
	Batch cooker	1.5 x 7 x 1.5 m	The larvae are effectively inactivated with the utmost respect for animal welfare. In addition, this process ensures that the larvae do not contain pathogens or other contaminants. This is a key step in achieving a safe and high-quality product.
	Coil dryer	2.16 x 6,75 x 1.57 m	The drying of the protein-rich fractions allows products to have good a shelf life.
	Screw press	2.7 x 1.2 x 0.7 m	The larvae are partially defatted to increase their protein content.
	Mill	1.6 x 2.2 x1.1 m	The protein meal will have the right particle size for use in various feeding applications.
	Pelletizer	2 x 1.5 x 1.5 m	Pellet processing can be used as a method to release nutrients slowly and steadily into the soil.
	Bagging plant	4 x 6 x 3.5 m	Last step before commercialisation

Financial assessment

A Limited Company (S.L.) is constituted and registered under the name "Insektech, S.L." prior to the start of the construction works.

The total value of the fixed assets amounts to 755,385 euros, including all machinery, furniture, and constructions carried out prior to the start of the productive activity. To be able to meet this amount of money it has been necessary to take out a loan of 1 million euros from a bank. The land value has not been included as it is privately owned and incorporated in the name of the company; thus, its acquisition value is zero, but with an estimated market value of 200,000 euros.

The conditions for loan repayment with constant instalments using a French repayment system with an interest rate of 2.2%. The years of repayment of the loan add up to a total of 20.

The indebtedness ratios in table 4, solvency and liquidity in table 5 and profitability in table 6 have been calculated to see how possible it will be to meet the short and long term payments to the different suppliers. Looking at the results, during the first five years after the establishment of the company, the liquidity ratio of the company remains low, but as the investment in fixed assets plan increases and the debt with the bank decreases, the company is more solvent and can meet its short and long-term obligations

Table 4. Indebtedness. Source: Own elaboration.

Indebtedness					
	2021	**2022**	**2023**	**2024**	**2025**
Indebtedness - Liabilities / (Liabilities + total equity)	98%	95%	90%	83%	75%

Table 5. Solvency and liquidity**.** Source: Own elaboration.

Solvency and liquidity					
	2021	**2022**	**2023**	**2024**	**2025**
Solvency (Assets / Liabilities due)	102%	106%	111%	120%	134%
Current Assets / Current Liabilities	82%	55%	29%	32%	45%

Table 6. Profitability. Source: Own elaboration.

Profitability					
	2021	**2022**	**2023**	**2024**	**2025**
Profit on sales (Result / Sales)	4%	5%	8%	11%	13%
Economic profitability (BAIT / Assets)	5%	5%	7%	9%	11%

The result of the IRR indicates that by the time the loan is fully repaid, the company will have made a profit of 160,000 euros, a fairly conservative estimate if the growth expectations of this type of business are met. As for the NPV, from the second year onwards the initial investment is recovered.

Conclusions

Insects are an alternative food source that can offer a cheap and efficient opportunity to overcome food insecurity by providing quality and nutritious food and feed. Their highly nutritious composition and economic accessibility make them the best alternative to traditional compound feeds. The benefits of using insects, go beyond animal and human feeding, from habitat conservation to waste reduction. Also, insects provide food at a low environmental cost contributing positively to livelihoods as well as playing a key role in nature. Black soldier fly positioners as the best alternative for mass-rearing insects for food and feed production, especially in countries dependent on protein sources; mass-rearing insects could reduce protein imports from other countries and would reduce production costs. Finally, for this project, a large initial capital investment is required to start up the company, however, profits can also be obtained with a smaller size facility for self-consumption and sale to small producers.

References

Buhlergroup.com. 2021. Bühler Insect Technology Solutions | Insect Protein | Bühler Group. [online] Retrieved from: https://www.buhlergroup.com/content/buhlergroup/global/en/industries/insect-technology.html. Accessed 30 May 2021.

Cortes Ortiz, J. A., Ruiz, A. T., Morales-Ramos, J. A., Thomas, M., Rojas, M. G., Tomberlin, J. K., . . . Jullien, R. L. (2016). Chapter 6 - insect mass production technologies. Insects as sustainable food ingredients (pp. 153-201) Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-802856-8.00006-5 Retrieved from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802856-8.00006-5

Dossey, A. T. (2016). Insects as sustainable food ingredients. San Diego, CA, USA: Elsevier Science. Retrieved from: http://unr-ra.scholarvox.com/book/88835174

Dunkel, F. V., & Payne, C. (2016). Chapter 1 - introduction to edible insects. Insects as sustainable food ingredients (pp. 1-27) Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-802856- 8.00001-6

Eric Duchemin. (2020). The european insect sector today: Challenges, opportunities and regulatory landscape. Retrieved from: http://agriurbain.hypotheses.org/4726

IFFIF annual report 2018

FAO. (2013). El ganado y los paisajes.

FAO. (2017). Livestock solutions for climate change

FAO. 2019. The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2019. The State of Food Security and Nutrition in the World 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns. Rome, FAO. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Feedipedia - animal feed resources information system. Retrieved from: https://www.feedipedia.org

Guía Técnia de aplicación al Reglamento Electrotécnico para Baja Tensión del Ministerio de Ciencia y Tecnología

Oonincx, Dennis G. A. B, van Broekhoven, S., van Huis, A., & van Loon, Joop J. A. (2015). Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. PloS One, 10(12), e0144601. doi:10.1371/journal.pone.0144601

PROteINSECT. Insect Protein Feed for the future: addressing the need for feeds on the future today Retrieved from: proteinsect-whitepaper-2016.pdf

Real Decreto 842/2002, de 2 de agosto: Reglamento Electrotécnico para Baja tensión e Instrucciones Técnicas Complementarias.

Teresina Mancuso, Liam Pippinato, & Laura Gasco. (2019). The european insects sector and its role in the provision of green proteins in feed supply. Calitatea, 20(S2), 374-381. Retrieved from: https://search.proquest.com/docview/2198414387

Van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annual Review of Entomology, 58(1), 563-583. doi:10.1146/annurev- ento-120811-153704

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

ASPECTOS VALORADOS POR LOS CONSUMIDORES A LA HORA DE COMPRAR O CONSUMIR ENSALADAS DE IV GAMA

J.M. Lorente, M. Serrano y *M.T. Pretel

Dpto. Biología Aplicada. Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), Universidad Miguel Hernández, Ctra Beniel-Orihuela, Km 3.2, 03312 Orihuela (Alicante) Spain. *mteresa.pretel@umh.es

Resumen

Entre las tendencias actuales en la alimentación, se encuentra el incremento del consumo de productos vegetales procesados en fresco a partir de frutas y hortalizas, también denominados productos mínimamente procesados o de IV Gama. Estos productos son más caros que el producto a granel ya que requieren una logística muy especializada, y los fabricantes necesitan identificar los factores que condicionan la aceptación por el consumidor a la hora de la compra. Sin embargo, hay pocos trabajos que estudien los aspectos que valoran y preocupan a los consumidores a la hora de comprar estas ensaladas preparadas. En el presente trabajo se presentan los resultados de una encuesta realizada a 297 consumidores sobre sobre la importancia que otorgan a aspectos medioambientales, económicos o beneficios para la salud, a la hora de comprar y/o consumir estas ensaladas 'ready to eat'. Este estudio ofrece una visión de los consumidores de vegetales mínimamente procesados, que podría ser interesante para que las empresas de elaboración y venta las tengan en cuenta para el diseño de nuevos productos o nuevos envases.

Palabras clave: vegetales mínimamente procesados; opinión consumidores; alimentación

ASPECTS VALUED BY CONSUMERS WHEN BUYING OR CONSUMING IV RANGE SALADS

Abstract

Among the current trends in food, there is the increase in the consumption of fresh processed vegetable products from fruits and vegetables, also called minimally processed or IV-Range products. These products are more expensive than bulk products as they require highly specialized logistics, and manufacturers need to identify the factors that condition consumer acceptance at the time of purchase. However, there are few works that study the aspects that value and concern consumers when buying these prepared salads. This paper presents the results of a survey carried out with 297 consumers on the importance they attach to environmental, economic or health benefits when buying and / or consuming these 'ready to eat' salads. This study offers a vision of the consumers of minimally processed vegetables, which could be interesting for the manufacturing and sales companies to take them into account when designing new products or new packaging.

Keywords: minimally processed vegetables; consumer opinion; feeding

Introducción

Las preocupaciones e intereses de la sociedad son aspectos que han influido en el cambio de la alimentación actual. Tanto la conservación del medio ambiente, como la alimentación saludable (Sanchez-Bel et al., 2015; De Corato, 2020) y las variaciones en los roles domésticos, condicionan los hábitos alimentarios de la población. En los últimos años ha aumentado la demanda de productos frescos, saludables y listos para consumir, como los vegetales mínimamente procesados, o de IV Gama (Gross et al., 2016; Baselice et al., 2017; Raffo et al. 2020; De Corato et al., 2020). Estos productos, tienen como objetivo facilitar el uso al consumidor y extender la vida útil entre 5 y 7 días a 4º C, respecto a los productos frescos sin procesar, asegurando su seguridad alimentaria y manteniendo su calidad nutricional y sensorial (Ares et al., 2008; De Corato et al., 2020; Wilson et al., 2019).

Son muchas las ventajas de las ensaladas de IV Gama, como menos tiempo de preparación de las comidas, y su disponibilidad durante todo el año. Sin embargo, también tienen desventajas. Entre los aspectos negativos de los vegetales mínimamente procesados destacan los riesgos microbiológicos y sensoriales a los que están expuestos (Ramos et al., 2013; Sant'Ana et al., 2020). Además, estos productos son más caros que el producto a granel, ya que requieren una logística muy especializada, y un sector de población con un poder adquisitivo medio (Cook 2008; Gross et al., 2016). Por tanto, la compra y el consumo de ensaladas de IV Gama se ven influidas por una combinación compleja de diferentes aspectos medioambientales, sociales, microbiológicos, sensoriales y nutricionales

Aunque el sector de los vegetales frescos cortados es un subsector dentro de la manipulación de frutas y hortalizas frescas con un gran potencial para el desarrollo de industrias ligadas a la transformación de vegetales, los fabricantes requieren estudios que permitan identificar los factores que condicionan la aceptación por el consumidor a la hora de la compra y, por tratarse de alimentos altamente perecederos, asegurar la estabilidad comercial durante el período de venta y postventa.

En este trabajo se ponen de manifiesto los aspectos más valorados a la hora de comprar y consumir ensaladas de IV Gama, que podrían ser de interés para que los fabricantes los consideraran a la hora de sacar nuevos productos al mercado.

Material y Métodos

Se realizó una encuesta a consumidores, diseñada a través de Google Drive y distribuida a través de diferentes redes sociales. Se recibieron 296 encuestas de consumidores cuyas características se muestran en la Figura 1. La mayoría de los encuestados (44.3%) tenían entre 36 y 50 años y el 30.7 % entre 51 y 65 años, siendo inferior al 30% el porcentaje de encuestados con menos de 35 años (Figura 1b). Más del 70% vivía en pareja, con o sin hijos (Figura 1d) y tenía trabajo fijo (Fifura 1e), con nivel de estudios universitarios (Figura 1c). De todas las respuestas recibidas, 69 no eran consumidores de ensaladas de IV Gama, a los que se preguntó el nivel de importancia (ninguna, poca, media, bastante, mucha) que otorgaban a diferentes aspectos para no consumir ensaladas de IV Gama.

En primer, lugar se estableció un perfil de la frecuencia de consumo de ensaladas preparadas a partir de las respuestas de los consumidores de estas ensaladas y el tipo de ensaladas consumidas (un solo ingrediente, varios ingredientes, ambos tipos). En segundo lugar, se evaluaron diferentes aspectos que el consumidor valora a la hora de comprar y consumir ensaladas de IV Gama.

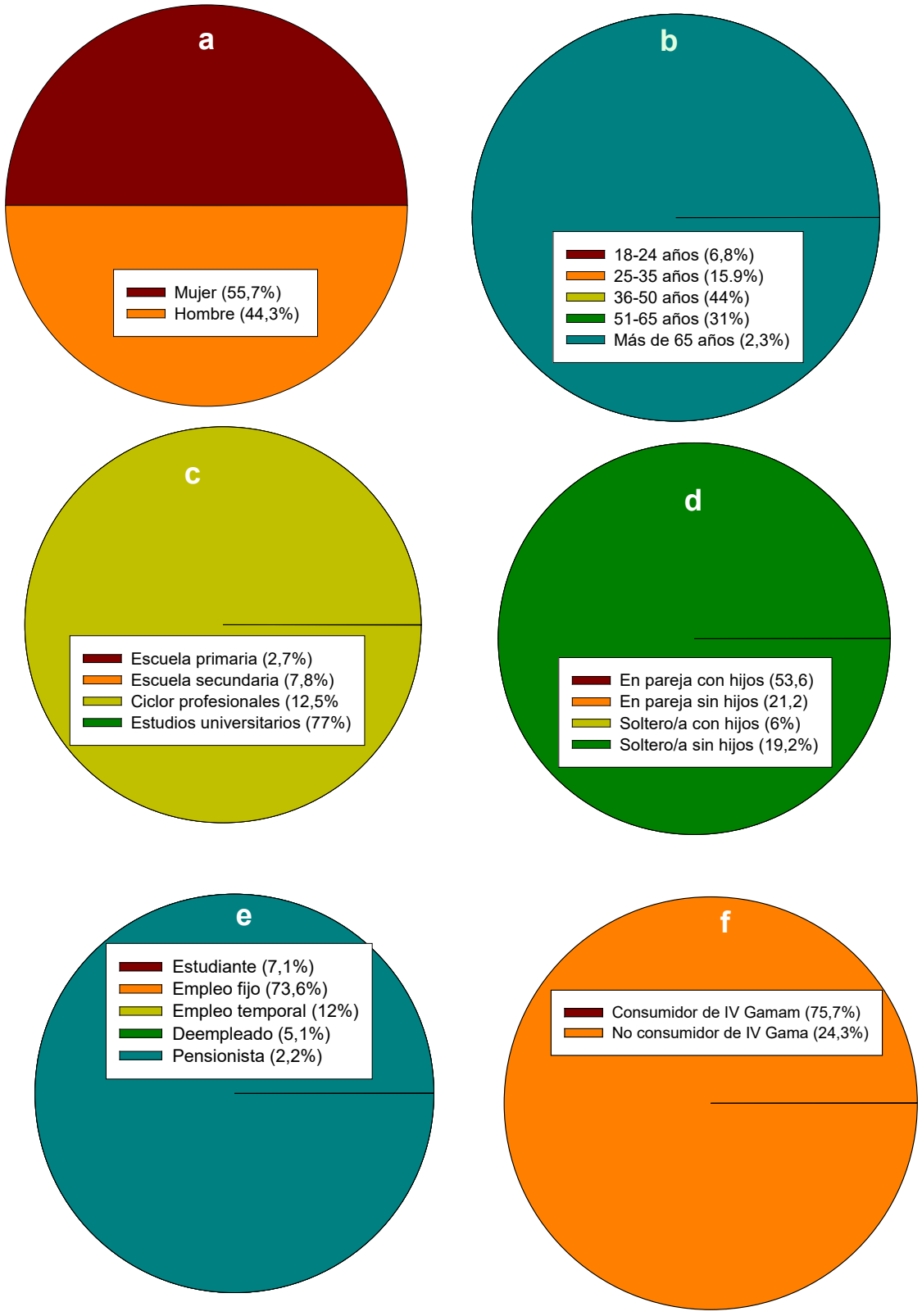


Figura 1. Perfil de los encuestados (297 encuestados).

Resultados y Discusión

El conocimiento y el hábito de consumo de ensaladas de IV Gama

La mayoría de las respuestas, 224 de las 297 respuestas recibidas, eran de consumidores de ensaladas preparadas, es decir, el 75.7% (Figura 1). En la Figura 2 se observa que la mayoría (40%) las consume 1 o 2 veces por semana y compra mezcla con varios ingredientes (56.7%), aunque un porcentaje alto (39%) consume tanto ensaladas con un solo ingrediente como con varios. Por tanto, el consumidor de ensaladas suele ser fiel a esta forma de presentación de los vegetales. Otras investigaciones ya han demostrado que las compras de alimentos tienden a ser habituales y repetidas en el tiempo (Carrasco et al., 2005; Gardner et al., 2011; Diniella et al., 2014).

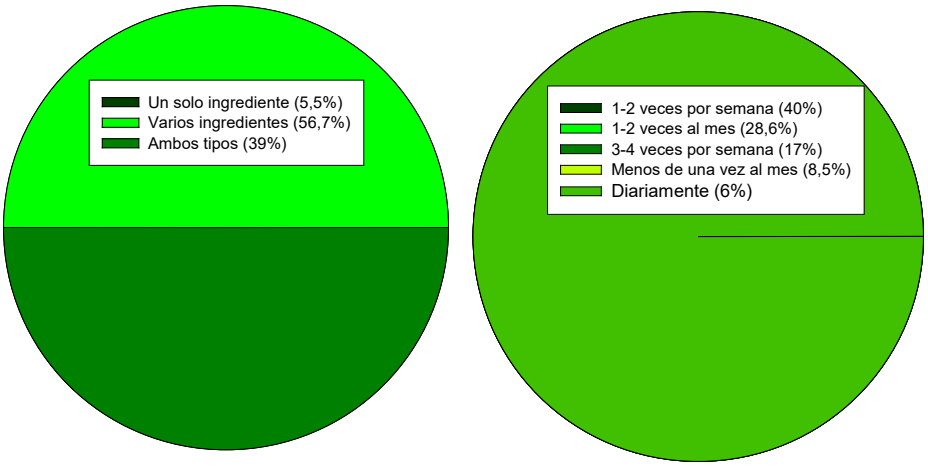


Figura 2. Perfil de los encuestados.

Importancia a diversos aspectos en el momento de la compra de ensaladas de IV Gama

El nivel de importancia (ninguna, poca, media, bastante, mucha) que los consumidores de IV Gama otorgaron a diferentes parámetros en el momento de la compra (Figura 3a) mostró que el 86,41% y el 76.32% de los consumidores considera entre medio y muy importante la variedad de ingredientes y el precio, respectivamente. Es interesante destacar que uno de los aspectos menos valorados por los consumidores de ensaladas de IV Gama fue la presencia de aliños y cubiertos, ya que casi el 70% de los consumidores le otorgó ninguna o baja importancia a su presencia en el envase. Por el contrario, el 71.87% otorgó entre media y mucha importancia a la cantidad de plásticos que se utilizan en los envases de estas ensaladas. Es probable que la aceptación de las ensaladas preparadas fuera mayor si los aliños y los cubiertos fueran opcionales, ya que reduciría la cantidad de plástico en el envase. Por otra parte, el 57.14% de los consumidores valoró, como bastante o muy importante la cantidad de compuestos bioactivos que contienen. Por tanto, os consumidores de ensaladas de IV Gama, a diferencia de los que no las consumen, valoran de forma muy positiva los beneficios para la salud que conlleva su consumo. En otros trabajos (Dinnella et al., 2014), ya se demostró el aumento del compromiso de los consumidores con el medio ambiente y la salud y de su valor nutritivo y funcional. En nuestro estudio, al igual que en el realizado por Dinnella et al. (2014), la fecha de caducidad y la apariencia fueron los aspectos que más tienen en cuenta los consumidores en el momento de la compra. En este sentido, en nuestro estudio (Figura 3b), si bien, el 79,9% de los consumidores de ensaladas preparadas consideraron entre bastante importante (26,33%) o muy importante (53,57%) la fecha de caducidad, valoran aún más el aspecto. La presencia de exudados, hojas pardeadas y deshidratadas es considerada como “muy importante” por el 61,6%, 66,5% y 70,53%, de los consumidores, respectivamente. Estos resultados coinciden con un estudio realizado por Ares et al. (2008), en el cual, el porcentaje de rechazo de los consumidores en el momento de la compra fue mayor a medida que aumentó la temperatura de almacenamiento, puesto que

la apariencia no era deseable ya que tuvieron en cuenta aspectos como el marchitamiento, la presencia de manchas marrones y necróticas en la superficie de la hoja y hojas con aspecto envejecido.

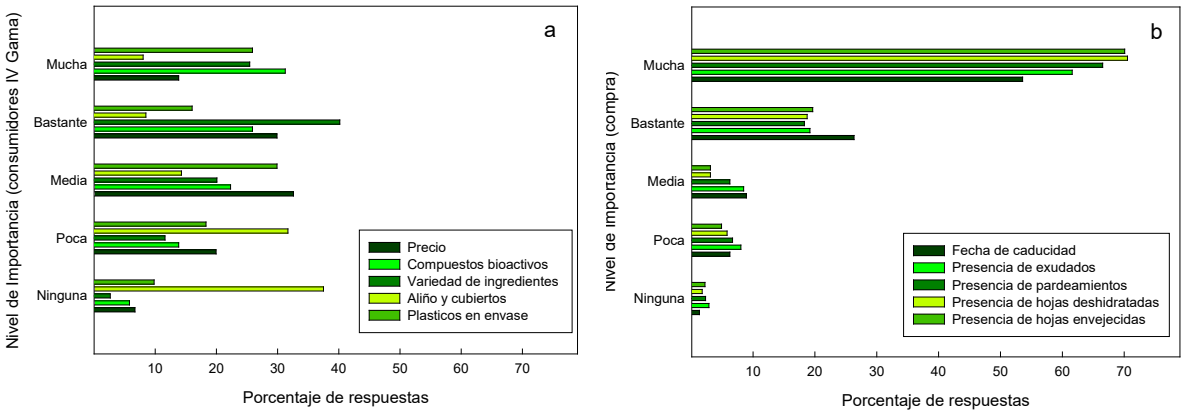


Figura 3. Aspectos valorados por los consumidores en el momento de la compra de ensaladas de IV Gama (224 respuestas).

Importancia a diversos aspectos en el momento del consumo de ensaladas de IV Gama

El nivel de importancia concedido por los consumidores al aspecto que presenta la ensalada de IV Gama una vez comprada, después de varios días en el frigorífico (Figura 4) muestra que la mayoría de los encuestados (71%) valoran con "mucha importancia" la presencia de olores extraños, mientras que la fecha de caducidad es menos valorada que a la hora de comprarla. La presencia de exudados, hojas pardeadas y deshidratadas a la hora de consumir el producto ya comprado, disminuye de "muy importante" a "bastante importante" en casi 10 puntos, aunque el aspecto sigue siendo muy valorado. Un estudio de Manzocco et al. (2017) indica que si la ensalada se consumiera el día de la compra, no habría desperdicio de ensalada, mientras que después de varios días de almacenamiento, la probabilidad de rechazo aumenta. En otro estudio realizado por Ares et al. (2008) los consumidores también rechazaron el consumo de las ensaladas una vez adquiridas cuando atributos relacionados con la calidad sensorial no se ajustaban a sus preferencias, y fueron más más duros al seleccionar un producto en la etapa de compra que en la etapa de consumo. Estos resultados coinciden con nuestro estudio, en el cual, los consumidores de ensaladas preparadas también fueron más estrictos en la etapa de compra que en la etapa de consumo.

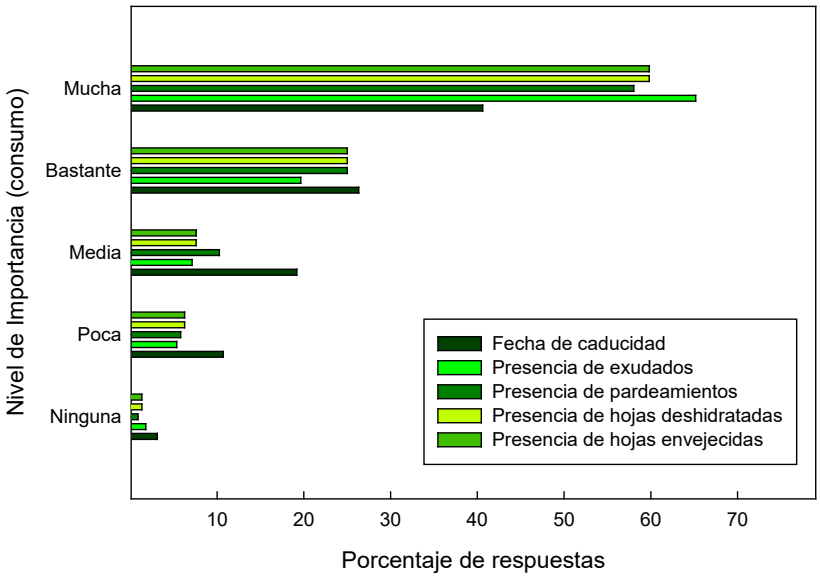


Figura 4. Aspectos valorados por los consumidores de ensaladas de IV Gama en el momento de su consumo (224 respuestas).

Cuando se preguntó a los consumidores si comprarían/consumirían la ensalada si alguno se los aspectos valorados no fuera de su agrado, los consumidores fueron más estrictos a la hora de la compra que en el momento del consumo, coincidiendo con los resultados obtenidos por Ares et al (2008). En nuestro estudio, el 64.4% de los consumidores nunca compraría la ensalada, frente al 53.3% de los encuestados, que nunca la consumiría. Es sorprendente que solamente al 4.3% de los encuestados les preocupa el desperdicio de alimentos. Estos resultados contrastan con la alta sensibilidad medioambiental que manifiestan tener los encuestados. Aunque se considera que la evitar el desperdicio de alimentos es una de las medidas más prometedoras para reducir el impacto ambiental, (Gentil et al., 2011; Stancu et al., 2013), los consumidores no parecen asociar el desperdicio de alimentos con el medio ambiente, sino más bien con el ahorro económico, y no es la mayor de sus preocupaciones. Estudios previos indican la baja voluntad de los consumidores para evitar el desperdicio de alimentos (Armitage y Conner, 2001; Stefan et al., 2013; Stancu et al., 2013). Por otra parte, el 23.9%, estaría dispuesto a comprar la ensalada dependiendo del precio, aspecto y fecha de caducidad, en conjunto. Por tanto, estarían dispuestos a sacrificar sus preferencias si el precio fuera razonable, lo que justifica las ofertas que presentan los supermercados sobre los productos con una fecha de caducidad próxima.

Razones por las que los encuestados no consumen ensaladas de IV Gama.

De 296 consumidores, solamente 69 contestaron que no consumían ensaladas de IV gama. (Figura 5). Más del 50% de los consumidores dieron baja o media importancia al precio, por lo que a pesar del incremento del coste sobre el producto fresco, no es el aspecto fundamental que los disuade de adquirir este tipo de productos. El aspecto que presentan tampoco es el motivo por el que no compran ensaladas preparadas, ya que el 76.7% otorga baja o media importancia a este parámetro. Más del 65% de los que no consumen estas ensaladas consideran entre medio y muy importante el hecho de que no son tan saludables como los productos frescos.

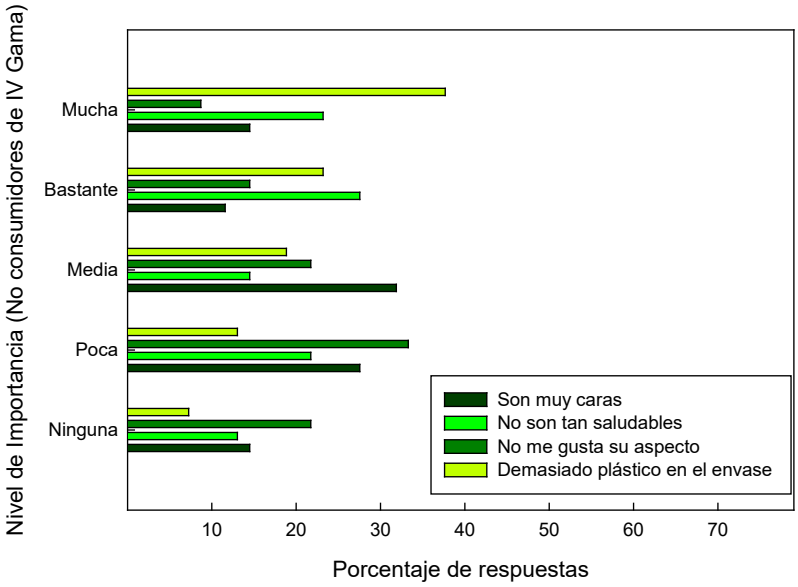


Figura 5. Razones por las que los encuestados no consumen ensaladas de IV Gama (69 respuestas).

Dentro del perfil del encuestado en este trabajo, el 79.7% de los consumidores dieron entre media y mucha importancia al empleo de plásticos en su envasado, siendo casi el 40% los que dan mucha importancia a este aspecto. La preocupación por el medio ambiente de los consumidores también se evidencia en un trabajo de Dinnella et al. (2014), en el que los encuestados otorgaron más importancia al empleo de envases respetuosos con el medio ambiente que a las propiedades sensoriales de las ensaladas. Según nuestro estudio, la creencia que tiene un sector de la población de que los vegetales frescos son más saludables que los mínimamente procesados, y el empleo de plásticos, son los dos aspectos que más disuaden a los consumidores de comprar ensaladas preparadas. Esta percepción de producto menos saludable que los productos frescos podría reducirse si se informara de forma más clara

en las etiquetas de la seguridad alimentaria, de calidad nutricional y medioambientales que presentan estos productos, como han indicado otros autores (Dinnella et al., 2014; Machin et al., 2014).

Conclusiones

Se encuestaron a 296 personas, entre las cuales el 55.7% fueron mujeres y el 44.3% hombres. La mayoría de ellos eran consumidores de productos de ensaladas de IV Gama, con edades comprendidas entre 36 y 65 años y con nivel de estudios universitarios. La mayoría de los consumidores de ensaladas de IV Gama las consume 1 o 2 veces por semana y con mezcla de varios ingredientes. Los aspectos que más tienen en cuenta los consumidores, en el momento de la compra, son la fecha de caducidad, la presencia de hojas pardeadas, con zonas podridas y deshidratadas. Estos aspectos también los tienen en cuenta los consumidores en el momento de su consumo, incluyendo la presencia de olores extraños. La apariencia del producto determina el propósito de compra y de su consumo. Sin embargo, los consumidores son más estrictos con la percepción del producto en la etapa de compra, que en la etapa de consumo. Los que no consumen ensaladas preparadas le dieron mucha importancia al empleo de plásticos en su envasado.

Bibliografía

Ares, G., Giménez, A. & Gámbaro, A. (2008). Sensory shelf life estimation of minimally processed lettuce considering two stages of consumers' decision-making process. Appetite, 50(2-3), 529-535.

Armitage, C. J. & Conner, M. (2001). Efficacy of the theory of planned behaviour: a,meta-analytic review. British Journal of Social Psychology, 40, 471e499. http://dx.doi.org/10.1348/014466601164939

Baselice, A., Colantuoni, F., Lass, D.A., Nardone, G. & Stasi, A. (2017). Trends in EU consumers' attitude towards fresh-cut fruit and vegetables. Food Quality and Preference, 59, 87-96.

Carrasco, R., Labeaga, J. M. & Lopez-Salido, J. D. (2005). Consumption and habits. Evidence from panel data. Economic Journal, 115, 144–165.

Cook, R. (2008). The dynamic U.S. fresh produce industry: An industry in transition. Fresh Fruit and Vegetable Marketing and Trade Information. http://are.ucdavis.edu/en/people/faculty/roberta-cook/articles-and-presentations/

De Corato, U. (2020). Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. Critical Reviews in food Science and Nutrition, 60 (6), 940–975. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025.

Dinnella, C., Torri, L., Caporale, G. & Monteleone, E. (2014). An exploratory study of sensory attributes and consumer traits underlying liking for and perceptions of freshness for ready to eat mixed salad leaves in Italy. Food Research International, 59, 108-116.

Gardner, B., de Bruijn, G. J., & Lally, P. (2011). A systematic review and meta-analysis of applications of the Self-Report Habit Index to nutrition and physical activity behaviours. Annals of Behavioral Medicine, 42, 174-187.

Gentil, E. C., Gallo, D., & Christensen, T. H. (2011). Environmental evaluation of municipal waste prevention. Waste Management, 31(12), 2371e2379. http:// dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2011.07.030.

Gross, K. C., Wang, C. Y. & Saltveit, M. (2016). In: Gross, K. C., C. Y. Wang, and M. Saltveit (Eds), The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. United States Department of Agriculture (USDA) – Agricultural Research Service–Agriculture Handbook, N 66, 780 pp. http://www.ars.usda.gov/is/np/indexpubs.

Machín, L., Giménez, A., Vidal, L., & Ares, G. (2014). Influence of context on motives underlying food choice. Journal of Sensory Studies, 29, 313–324.

Manzocco, L., Alongi, M., Lagazio, C., Sillani, S., & Nicoli, M. C. (2017). Effect of temperature in domestic refrigerators on fresh-cut Iceberg salad quality and waste. Food research international, 102, 129-135.

Raffo, A., Senatore, M., Moneta, E., Paoletti, F., Peparaio, M. & Civitelli, E.S. (2020). Impact of different temperature abuse scenarios on sensory quality and off-odour formation in ready-to-eat salad leaves. International Journal of Food Science and Technology. Doi:10.1111/ijfs.14858.

Ramos, B., Miller, F.A., Brandão, T.R., Teixeira, P. & Silva, C.L. (2013). Fresh fruits and vegetables-An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 20, 1-15.

Sanchez-Bel, P., Romojaro, A., Egea, I., & Pretel, M. T. (2015). Wild edible plants as potential antioxidant or nutritional supplements for beverages minimally processed. LWT-Food Science and Technology, 62(1), 830-837 DOI: 10.1016/j.lwt.2014.06.017.

Sant'Anna P., Bernadette, D.G., De Melo-Franco, B. & Maffeic, D. (2020). Microbiological safety of ready-to-eat minimally processed vegetables in Brazil: an overview. J Sci Food Agric, 100, 4664-4670.

Stancu, V., Haugaard, P. & Lähteenmmäki, L. (2016). Determinants of consumer food waste behaviour: Two routes to food waste. Appetite, 96, 7-17.

Stefan, V., van Herpen, E., Tudoran, A. A., & Lähteenmäki, L. (2013). Avoiding food waste by Romanian consumers: the importance of planning and shopping routines. Food Quality and Preference, 28(1), 375-381. http://dx.doi.org/10.1016/ j.foodqual.2012.11.001.

Wilson, M.D., Stanley, R.A., Eyles, A. and Ross, T. (2019). Innovative processes and technologies for modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut fruits and vegetables, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59:3, 411-422, DOI: 10.1080/10408398.2017.1375892

Sesión 4:

Producción, Bienestar, Genética y Calidad en la Producción Animal.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Crioconservación de dos líneas de conejos seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada

B. Ruiz, M.L. García y M.J. Argente

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University, Ctra. de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela. Email: blanca.ruiz02@goumh.umh.es

Resumen

Se ha llevado a cabo un experimento de selección divergente por variabilidad de tamaño de camada al nacimiento en conejo en las instalaciones de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Se ha utilizado como criterio de selección, la varianza fenotípica del tamaño de camada al nacimiento dentro de hembra, después de corregirlo por los efectos ambientales de parto-estado fisiológico de la hembra y la estación del año. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta correlacionada en la supervivencia y el desarrollo embrionario temprano después de 15 generaciones de selección por variabilidad del tamaño de camada, así como la creación de un banco de germoplasma de las líneas de este experimento. En la generación 15, se recogieron 411 embriones de 72 horas post-monta de 23 hembras de la línea seleccionada para disminuir la variabilidad del tamaño de camada (línea homogénea en tamaño de camada) y de 29 hembras de la línea seleccionada para incrementar la variabilidad el tamaño de camada (línea heterogénea en tamaño de camada), y solo se vitrificaron embriones normales. Los embriones fueron clasificados según su desarrollo en inicios de mórulas o mórulas compactas. En este trabajo, también se ha analizado el peso de la hembra, la tasa de ovulación, la tasa de recuperación y el desarrollo de los embriones. Las líneas mostraron un peso similar a 72 horas post-monta. Tampoco se observaron diferencias entre líneas en tasa de ovulación y de recuperación de embriones. Sin embargo, los embriones de la línea homogénea mostraron un desarrollo embrionario más avanzado a 72 horas que los de la línea heterogénea. Se han vitrificado un total de 162 embriones de la línea homogénea y 184 embriones de la línea heterogénea. En conclusión, un mayor desarrollo a 72 horas en la línea homogénea podría estar relacionado con su mayor tasa de implantación, reportada en otros trabajos. Además, el número de embriones vitrificados garantiza el mantenimiento de las líneas para futuros trabajos.

Palabras clave: conejo, embrión, mórula, tamaño de camada, vitrificación.

Cryoconservation of two lines of rabbits divergently selected for litter size variability.

Abstract

An experiment based on a divergent selection of litter size variability at birth in rabbits has been carried out in Miguel Hernández University. The selection criterion was phenotypic variance of litter size within the female at birth, after correcting for parity-physiological status and season. The aim of this study is to evaluate the correlated response in survival and early embryonic development after 15 generations of selection for variability litter size, as well as to create a germplasm bank in the lines of the divergent selection experiment for litter size variability. In generation 15, 411 embryos were recovered at 72 hours post coitum from 23 females of the line selected to decrease litter size variability (homogenous line in litter size) and 29 females of line selected to increase litter size variability (heterogenous line in litter size). Only normal embryos were vitrified. Embryos were classified as early morula or compact morula. In this study, female weight, ovulation rate, recovery rate and embryo development have also been analyzed. Both lines showed a similar weight at 72 hours post coitum. No differences were observed in ovulation and recovery rate between the lines. However, embryos from the homogeneous line showed more advanced embryonic development at 72 hours than those from the heterogenous line. A total of 162 embryos from the homogeneous line and 184 from the homogeneous one was vitrified. In conclusion, a higher embryo development at 72 hours in the homogeneous line could be related with its higher implantation rate, as reported in other studies. In addition, the number of vitrified embryos guarantees the maintenance of the lines for future studies.

Keywords: embryo, maternal line, morula, litter size, vitrification.

Introducción

En los últimos años se ha observado un aumento en el interés por la determinación genética de la varianza ambiental en producción animal. La selección para reducir la varianza ambiental produciría animales que se adaptan mejor a su entorno, conllevando así a una mejora en el bienestar animal (Broom, 2008). Se está llevando a cabo con éxito un experimento de selección divergente por variabilidad del tamaño de camada en conejos (Blasco et al., 2017). Después de catorce generaciones de selección, la línea H (seleccionada para incrementar la variabilidad del tamaño de camada) y la línea L (seleccionada para disminuir la variabilidad del tamaño de camada) difirieron para el carácter seleccionado un 4,5% de la media de la población base. Además, se ha encontrado que la línea L es menos sensible al estrés y a enfermar, siendo por tanto más resiliente que la línea H (Argente et al., 2019; Beloumi et al., 2020; García et al., 2012). Por otro lado, se ha observado que disminuir la variabilidad conduce a un incremento en el tamaño de camada; concretamente, la línea L presenta casi un gazapo más al parto que la línea H (Blasco et al., 2017). El tamaño de camada depende de la tasa de ovulación y de las supervivencias embrionarias y fetales (Argente et al., 1999). La tasa de ovulación es el carácter limitante del tamaño de camada y las pérdidas embrionarias tempranas están relacionadas con el desarrollo embrionario (Badawy et al., 2016). Por tanto, el estudio del desarrollo embrionario ayudaría a explicar la diferencia en el tamaño de camada entre las líneas.

Los bancos de embriones son importantes en los programas de mejora genética animal para estimar la respuesta a selección mediante población control y como medida de bioseguridad (Vicente y Garcia-Ximenez, 1996). Los recientes avances en la crioconservación de ovocitos y embriones de mamíferos se han logrado exclusivamente con la vitrificación. Los protocolos de vitrificación comparados con los de congelación son más sencillos y no son necesarios ultracongeladores. Sin embargo, la toxicidad de los crioprotectores usados durante la vitrificación es más elevada. Por ello, la tasa de supervivencia embrionaria tras la vitrificación difiere según el método de criopreservación, el tipo y la concentración de crioprotectores, las tasas de enfriamiento, así como la calidad del embrión (Viudes de Castro et al., 2010). La mórula parece ser el estado embrionario que tolera mejor los cambios osmóticos y la toxicidad de las soluciones de vitrificación altamente concentradas (Vicente y Garcia-Ximenez, 1996).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta correlacionada en la supervivencia y el desarrollo embrionario temprano después de 15 generaciones de selección por variabilidad del tamaño de camada, así como la creación de un banco de embriones vitrificados de las líneas del experimento de selección divergente por variabilidad del tamaño de camada.

Material y Métodos

Declaración de ética

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche, de acuerdo con las Directivas del Consejo 98/58/CE y 2010/63/UE (número de referencia TFM.MTC.MJAC.BRC.210510).

Material animal

En el estudio se utilizaron conejas adultas multíparas de las dos líneas del experimento de selección divergente por variabilidad del tamaño de camada de la generación 15. El criterio de selección fue la varianza fenotípica del tamaño de camada al nacimiento dentro de la hembra (Blasco et al., 2017). La línea H engloba a las hembras seleccionadas para aumentar la variabilidad del tamaño de la camada, mientras que la línea L hace referencia a las hembras seleccionadas para disminuir dicha variabilidad.

Se realizaron 7 sesiones de recuperación de embriones. En ellas se obtuvieron un total de 411 embriones provenientes de 29 hembras de la línea H y de 23 de la línea L. Las conejas se pesaron y fueron sacrificadas a las 72 horas post-monta para la extracción inmediata del tracto reproductivo (Figura 1).

De él se retiraron los ovarios y se contaron los cuerpos lúteos para la estimación de la tasa de ovulación (TO). Los embriones totales (ET) se recuperaron en una placa Petri de vidrio mediante perfusión de los

oviductos con 5 ml de medio de lavado formado por Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) y 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA).



Figura 1. Tracto reproductivo extraído de la hembra a las 72h post-monta.

Los embriones fueron lavados para eliminar restos de sangre. A continuación, con ayuda de un microscopio estereoscópico binocular se contabilizó el número de embriones totales recuperados (ET); todo ello se realizó a temperatura ambiente. Los embriones recuperados se clasificaron en: embriones normales (EN) cuando presentaron forma regular y la capa de mucina y zona pelúcida estaban intactas y regulares, embriones anormales (EA) con estructura de irregular, y oocitos (OC). La tasa de recuperación (TR) fue calculada como:

$$TR = \frac{EN + EA + OC}{TO} \quad (1)$$

Los embriones normales se clasificaron según su grado de desarrollo en inicio de mórula (IM) y mórula compacta (MC) (Figura 2 y 3). Las tasas de IM y MC se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Tasa IM} = \frac{\text{EN clasificados como IM}}{\text{EN}} \quad (2)$$

$$\text{Tasa MC} = \frac{\text{EN clasificadas como MC}}{\text{EN}} \quad (3)$$

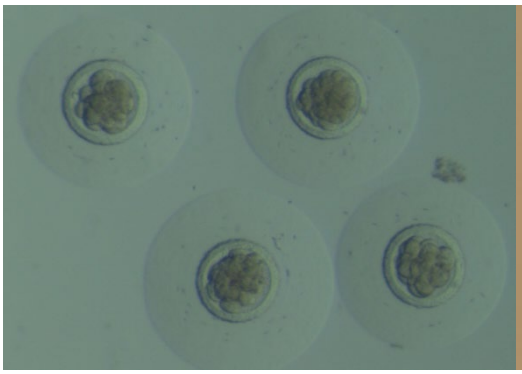


Figura 2. Inicio de mórula.

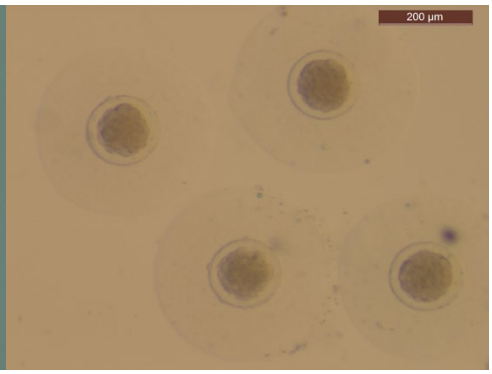


Figura 3. Mórula compacta

Proceso de vitrificación

El proceso de vitrificación ha sido ampliamente descrito por Vicente y García-Ximénez (1996). La solución crioprotectora presentó la siguiente composición: 1:1:2 (v/v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO 3,5 M), etilenglicol (EG 4,4 M) y DPBS. Sólo los EN fueron vitrificados. El proceso de vitrificación se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se sumergieron los EN en 0,2 ml de medio de lavado y 0,2 ml de medio de vitrificación durante 2 minutos. En la segunda etapa se añadieron 0,6 ml de medio de vitrificación. El tiempo de exposición de los embriones a la solución final de vitrificación no excedió de 1 minuto.

Los embriones vitrificados (EV) se cargaron en pajuelas de 0,25 ml (Figura 4), las cuales fueron selladas con un plástico e introducidas en diferentes canister (Figura 5). Finalmente, las pajuelas se sumergieron directamente en nitrógeno líquido a -196ºC.

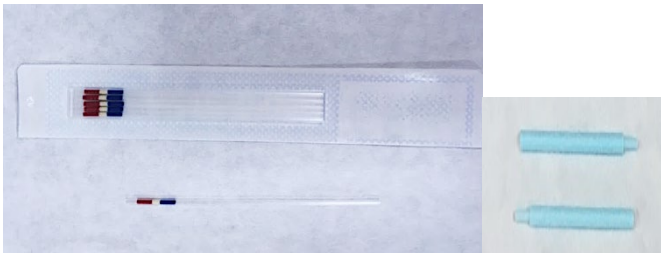


Figura 4. Pajuelas y sellado (inferior derecha) utilizadas para la vitrificación.

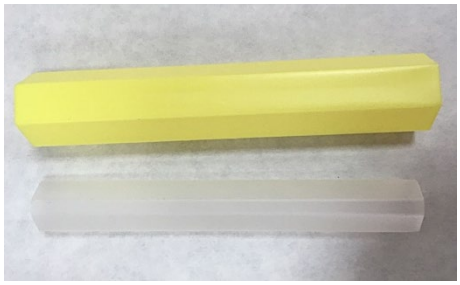


Figura 5. Canister.

Caracteres trabajados

Los caracteres medidos durante el experimento fueron son los siguientes:

- Peso de la hembra
- Tasa de ovulación
- Embriones normales
- Tasa de recuperación
- Inicio de mórula
- Mórulas compactas
- Embriones vitrificados

Modelo estadístico

Todos los caracteres se analizaron con un modelo que incluía únicamente el efecto de línea (H y L). Para los embriones normales se incluyó también la tasa de ovulación como covariable. Todos los caracteres se analizaron mediante metodología bayesiana (Blasco, 2017).

Resultados y Discusión

Las líneas H y L mostraron un peso similar en el momento de la monta (D_{H-L} = 64 g., p=0.70, Tabla 1). El peso es ligeramente superior a hembras multíparas de otras líneas maternales (Belabbas et al., 2021).

La TO fue similar en ambas líneas (D_{H-L} = 0.2 g., p=0.58). Este resultado es reiterativo con el encontrado en generaciones anteriores, y corrobora que la selección por variabilidad en tamaño de camada no tiene una respuesta correlacionada en la TO (Argente et al., 2017).

Tabla 1. Diferencias para el peso, la tasa de ovulación (TO), la tasa de recuperación (TR), los embriones normales (EN), la clasificación embrionaria (Inicio de mórula, IM; Mórulas compactas, MC) y los embriones vitrificados (EV) para la línea H y la línea L.

Parámetros	H	L	D_{H-L}	$HPD_{95\%}$	p
Peso (g)	3772	3706	64	-168, 319	0,70
TO	10,6	10,4	0,2	-1,1, 1,4	0,58
TR	0,72	0,76	-0,04	-0,17, 0,12	0,69
EN	6,5	7,3	-0,8	-2,6, 1,1	0,80
IM	0,24	0,07	0,17	-0,01, 0,37	0,97
MC	0,76	0,93	-0,17	-0,36, 0,01	0,97
EV	6,6	7,4	-0,8	-2,8, 1,4	0,78

H: media de la línea seleccionada para incrementar la variabilidad del tamaño de camada. L: media de la línea seleccionada para disminuir la variabilidad del tamaño de camada. D_{H-L}: diferencia entre la línea H y L. $HPD_{95\%}$: Intervalo de alta densidad posterior al 95%. p: probabilidad de que la diferencia sea > 0 cuando $D_{H-L} > 0$ o sea < 0 cuando $D_{H-L} < 0$.

La eficacia del proceso de recuperación embrionaria, medida como TR fue similar entre las líneas, siendo de aproximadamente de 0,75 (p=0,69). La línea L mostró un 12,3% más de EN que la línea H, siendo la diferencia entre las líneas de 0,8 EN (p=0,80). La línea L presentó un mayor desarrollo embrionario, pues mostró menos embriones clasificados como IM (0,07) y más MC (0,93, p=0,97). Este resultado concuerda con los obtenidos para las líneas en generaciones anteriores (García et al, 2016; Calle et al., 2017). La supervivencia del embrión que llega al entorno del útero en un estado menos desarrollado puede estar comprometida en las primeras etapas de la gestación debido a la asincronía entre el grado de desarrollo del embrión y el ambiente uterino (Geisert y Schmitt, 2002; Hunter et al., 2004).

La mayor susceptibilidad al estrés de la línea H frente a la línea L (Argente et al., 2019; Beloumi et al., 2020) podría justificar el menor grado de desarrollo de sus embriones y la menor supervivencia embrionaria.

El número de EV por hembra fue de 6,6 para la línea H y 7,4 para la línea L. Se vitrificaron todos los EN (184 embriones de la línea H y 162 embriones de la línea L). La ligera discrepancia entre el número de EN y EV puede relacionarse con la corrección por TO introducida como covariable en el número de EN. El número de EV garantiza la salvaguarda del material genético excepcional que se ha generado, al ser la primera vez que se ha seleccionado divergentemente dos líneas por sensibilidad ambiental con éxito (Blasco et al., 2017). Además, la población crioconservada permitirá evaluar la respuesta a la selección con la reconstitución de una población control (García y Baselga, 2002) o realizar estudios reproductivos (Mocé et al., 2004).

Conclusiones

En conclusión, la selección para la variabilidad del tamaño de la camada no pareció afectar a la TO, pero sí al desarrollo embrionario en donde la línea L mostró un progreso más avanzado que la línea H. Además, se ha constituido un banco de embriones crioconservados de las líneas para ser utilizado en estudios posteriores.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el proyecto AGL2017-86083-C2-2-P del Ministerio de Ciencia e Innovación (MIC)-Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Bibliografía

Argente, M.J., Calle, E.W, Garcia, M.L., Blasco, A., 2017. Correlated response in litter size components in rabbits selected for litter size variability. Journal of Animal Breeding ang Genetics. 134 (6), 505-51. https://doi.org/10.1111/jbg.12283.

Argente, M.J., García, M.L., Zbyňovská, K., Petruška, P., Capcarová, M., Blasco, A., 2019. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits' resilience. Animal. 13 (10), 2348-2355. https://doi.org/10.1017/S1751731119000302.

Argente M.J., Santacreu M.A., Climent A., Blasco A., 1999. Phenotypic and genetic parameters of birth weight and weaning weight of rabbits born from unilaterally ovariectomized and intact does. Livestock Production Science. 57, 159–167.

Badawy, A.Y., Peiró R., Blasco A., Santacreu M.A., 2016. Effect of increased ovulation rate on embryo and foetal survival as a model for selection by ovulation rate in rabbits. world rabbit science. 24, 87-94.

Belabbas, R., Garcia, M.L., AinBaziz, H., Berbar, A., Argente, M.J., 2021. Litter size component traits in two Algerian rabbit lines. World Rabbit Science. 29 (1), 51-58. https://doi.org/10.4995/wrs.2021.14247.

Beloumi D., Blasco, A., Muelas, R., Santacreu, M.A, Garcia, M.L., Argente, M.J., 2020. Inflammatory Correlated Response in Two Lines of Rabbit Selected Divergently for Litter Size Environmental Variability. Animals. 10 (9), 1540. https://doi.org/10.3390/ani10091540.

Blasco, A., 2017. Bayesian data analysis for animal scientists. Springer.

Blasco, A., Martínez-Álvaro, M., García, M.L., Ibáñez-Escriche, N., Argente, M.J., 2017. Selection for genetic environmental sensitivity of litter size in rabbits. Genet. Sel. Evol., 49, 48-55.

Broom D.M., 2008. Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts. Annu Rev Biomed Sci. 20, 79–90. http://dx.doi.org/10.5016/1806-8774.2008.v10pT79.

Calle, E.W., Garcia, M.L., Blasco, A., Argente, M.J., 2017. Correlated response in early embryonic development in rabbits selected for litter size variability. World Rabbit Science. 25 (4), 323-327.

García M.L., Argente M.J., Muelas R., Birlanga V., Blasco A., 2012. Effect of divergent selection for residual variance of litter size on health status and welfare. World Rabbit Science. 103-106.

García, M.L., Baselga, M., 2002. Estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits using a cryopreserved population. Livestock production science. 74(1), 45-53. https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00280-9.

Garcia, M.L., Blasco, A., Argente, M.J., 2016. Embryologic changes in rabbit lines selected for litter size variability. Theriogenology. 86(5), 1247-1250. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.065.

Geisert R., Schmitt R., 2002. Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? Journal of Animal Science. 80, 54-65. https://doi.org/10.2527/animalsci2002.0021881200800ES10009x.

Hunter, M.G., Robinson, R.S., Mann, G.E., Webb, R., 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. Anim Reprod Sci. 83, 461-77.

Mocé, M. L., Santacreu, M. A., Climent, A., Blasco, A., 2004. The effect of divergent selection for uterine capacity on prenatal survival in rabbits: Maternal and embryonic genetic effects, Journal of Animal Science. 82 (1), 68–73.

Vicente J.S., Garcia-Ximénez F., 1996. Direct transfer of vitrified rabbit embryos. Theriogenelogy. 45 (4), 811-815. https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00010-6.

Viudes de Castro, M.P., Cortell, C., Vicente, J.S. 2010. Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. Theriogenology. 74, 1623-1628. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.034.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Conductas individuales y expresiones faciales en ovinos estabulados criados libres de parásitos gastrointestinales.

A.A. Luna Bojórquez [1], P.G. González Pech [1], F.A. Méndez Ortíz [2], C.A. Sandoval Castro [1], J.F.J. Torres Acosta [1]

[1] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, kilómetro 15,5 Carretera Mérida-Xmatkuil, C.P. 97315, Mérida, Yucatán, México, e-mail: alicialuboj@gmail.com
[2] Escuela Superior de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Campeche. Calle 53 S/N, Col. Unidad, Esfuerzo y Trabajo #2. C.P. 24350, Escárcega, Campeche, México

Resumen

Los referentes sobre la conducta en animales libres de incomodidad física o enfermedades son necesarios para evaluar la repercusión en un contexto menos favorable. Nuestro objetivo fue cuantificar la frecuencia de conductas individuales y expresiones faciales en ovinos estabulados bajo condiciones adecuadas de densidad animal y criados libres de parásitos gastrointestinales. El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Veterinaria de Mérida en México (clima cálido subhúmedo y lluvias en verano), se utilizaron 21 corderos hembras (11,9±3,6kg) y 21 corderos machos (10,1±2,9kg), de las razas Blackbelly y Pelibuey. Los animales se mantuvieron en lotes con una densidad de 1,3m^2/ por animal. Al inicio del estudio todos fueron desparasitados con Sulfóxido de Albendazol 5 mg/kg PV y Levamisol 7,5 mg/kg PV y el estatus de libre de infección verificado por examen individual de heces (flotación y McMaster). La alimentación fue con heno molido y concentrado en ración balanceada para permitir una ganancia de peso de 125 g al día. El alojamiento se limpió cada 2 días, se dispuso de la mitad de la superficie de sombra, piso de concreto y agua limpia *ad libitum*. Una vez al día a las 2 de la tarde, durante nueve días consecutivos se registró individualmente la presencia o ausencia de expresiones normales (EN): perfil de labio y mandíbula recto (PL^1); posición horizontal de las orejas (PO^1), apertura de ojos >40º (AO^1), ollares nasales en forma de u (OLL^1). También se recogieron las conductas y expresiones de incomodidad o dolor (CEI): posición encorvada (pe), muerde el pelo propio o ajeno (mp), muerde objetos o rejas (mc), bruxismo (b), perfil de labio y mandíbula convexo (PL^2); posición hacia abajo de las orejas (PO^2), apertura de ojos <40º (AO^2), ollares en forma de v (OLL^2). En promedio las EN representaron el mayor porcentaje de conductas observadas (P<0,001) con 88,8±2,3% y las CEI solo 11,2±2,3%. El promedio por día y por animal de las EN fue de 3,8±0,2 y para las CEI de 0,5±0,1. Las ENs contribuyeron de manera consistente en un rango de 20 a 23% del total observado en el período, en tanto que las CEI resultaron en mc 3,4%, mp 3,3%, OLL2 2,4%, PO2 1,1%; para PL2, AO2 y b, fueron <0,7%, pe no se observó. Se concluyó que los ovinos en condiciones de estabulación óptima, presentan en mayoría acciones y expresiones faciales neutras.

Palabras clave: conducta, expresiones faciales, estabulación, ovinos de pelo, bienestar.

Individual behaviors and facial expressions in housed sheeps raised free of gastrointestinal parasites.

Abstract

Behavioral references in animals free of physical discomfort or disease are necessary to evaluate the impact in a less favorable context. Our objective was to quantify the frequency of individual behaviors and facial expressions in sheep housed under appropriate stocking density conditions and raised free of gastrointestinal parasites. The study was carried out at the Veterinary School of Merida in Mexico (warm sub-humid climate and summer rains), using 21 female lambs (11,9±3,6kg) and 21 male lambs (10,1±2,9kg), Blackbelly and Pelibuey breeds. The animals were kept in flocks with a density of 1,3m^2/ per animal. At the beginning of the study all were dewormed with Albendazole Sulfoxide 5 mg/kg LW and Levamisole 7,5 mg/kg LW and the infection-free status verified by individual fecal examination (flotation and McMaster). Feeding was with ground hay and concentrate in balanced ration to allow a weight gain of 125g per day. The housing was cleaned every 2 days, half shaded area, concrete floor and clean water ad libitum. Once a day at 2 p.m. for nine consecutive days, the presence or absence of normal

expressions (NE) was individually recorded: lip and jaw profile straight (JP^1); horizontal position of the ears (PE^1), eye opening >40º (EO^1), u-shaped nostrils (NOS^1). Behaviors and expressions of discomfort or pain (BED) were also collected: stooped position (sp), bites own or others' hair (bh), bites objects or grates (bo), bruxism (b), convex lip and jaw profile (JP^2); downward position of the ears (PE^2), eye opening <40º (EO^2), v-shaped nostrils (NOS^2). On average, NE represented the highest percentage of observed behaviors (P<0,001) with 88,8±2,3% and BED only 11,2±2,3%. The average per day per animal for NEs was 3,8±0,2 and for IECs 0,5±0,1. NEs contributed consistently in the range of 20 to 23% of the total observed in the period, while BEDs resulted in bo 3,4%, bh 3,3%, NOS^2 2,4%, PE^2 1,1%; for JP^2, EO^2 and b, they were <0,7%, sp was not observed. It was concluded that sheep in optimal housing conditions, present mostly neutral actions and facial expressions.

Keywords: behaviour, facial expressions, housing, hair sheep, welfare.

Introducción

El bienestar animal (B.A.) podemos definirlo como la forma en que los animales se enfrentan a las condiciones de su entorno, a los esfuerzos que realizan para adaptarse al medio ambiente en el que se encuentran. La evaluación del B.A. se basa en tres puntos que responden a las necesidades básicas de los animales: su estado físico, su estado mental y las condiciones de su entorno que, en condiciones no naturales, dependen en gran medida de la acción del hombre (OIE, 2021). Los animales son seres sintientes con necesidades básicas como la capacidad de sentir dolor, placer y tener una conciencia básica (Villegas-Aleksov, 2021).

Para la evaluación del B.A. existen indicadores basados en los requerimientos fisiológicos como las Cinco Libertades (Manteca et al., 2012) que se enfocan en que los animales estén libres de hambre, sed, incomodidad física y térmica, dolor, lesiones, enfermedad, de miedo y stress, y de expresar sus comportamientos naturales. Para dar una validez a estas evaluaciones, es necesario tomar en cuenta varios factores, realizar observaciones directas de los animales, de su entorno, del manejo y de los recursos proporcionados.

En la práctica, en los sistemas de producción de rumiantes, es necesario tener indicadores prácticos que nos permitan evaluar la ausencia o presencia a diferentes intensidades de dolor, disconfort o distress. Ante la presencia de enfermedad patente, son fácilmente identificables las manifestaciones clínicas evidentes, en cuadros subclínicos no. Sin embargo, es probable que también la conducta animal por ejemplo las expresiones faciales, puedan utilizarse para identificar animales con alguna infección en fase de establecimiento o algún estado de disconfort en diferentes niveles de severidad. Trabajos como los de Manteca et al. (2017) ya permiten utilizar la conducta animal como guía en la evaluación del dolor en el ganado ovino.

Al ser seres sintientes, los animales poseen la capacidad de manifestar conductas y expresiones faciales indicadoras de situaciones tanto negativas como positivas. Es importante validar y contribuir a ajustar los etogramas de expresiones faciales y su frecuencia de presencia bajo condiciones de estabulación, ello permitirá conformar los parámetros que puedan servir para comparar bajo diferentes contextos de estabulación y su posterior relación con el bienestar animal. El objetivo de este trabajo es cuantificar las expresiones faciales y posición corporal vinculados a disconfort en ovinos en condiciones de engorde estabulado en buenas condiciones de espacio, alimentación y manejo general.

Material y Métodos

Lugar de estudio

El estudio se realizó en la unidad de nutrición de rumiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (FMVZ-UADY) de junio a julio del 2020. El clima

es cálido subhúmedo con lluvias en verano y una temperatura promedio de 26°C. El protocolo experimental formó parte de una tesis de maestría y fue aprobado por el comité de bioética con el número CB-CCBA-I-2020-001.

Alojamiento

Los corrales de estancia utilizados forman parte del área de nutrición de rumiantes de la FMVZ-UADY. Cuenta con una orientación longitudinal este-oeste, el piso es de concreto y los límites del corral son de tubería forrada con malla de alambre. Cuenta con techo de lámina con inclinación de 15 grados y altura de 3,5 m, y brinda un espacio de sombra de 4 m de ancho x 3,5 m de largo y de sol de 4 m de ancho x 7 m de largo durante el medio día. El espacio de comedero se brindó mediante contenedores de plástico disponiendo 10 comederos de 50 cm de diámetro lineal por animal. El bebedero fue un cajón de plástico con capacidad de 35 lts de 70 cm x 45 cm llenado todos los días. Los corrales fueron limpiados por trabajadores del área cada segundo día. Los animales permanecieron en estos corrales durante 146 días (del 18 de marzo al 10 de agosto del 2020) hasta que fueron trasladados a corrales de otra área para ser utilizados en un experimento contemporáneo sobre metabolismo de nutrientes. Las observaciones de conducta fueron efectuadas del día 23 de junio al 3 de julio con un periodo de dos días de descanso, y del día 6 al 10 de julio.

Animales experimentales

Se utilizaron 42 corderos de las razas Blackbelly y Pelibuey, 21 hembras (8 Blackbelly y 13 Pelibuey) con peso promedio de 11,9 ± 3,6 kg y 21 machos (11 Blackbelly y 10 Pelibuey) con peso promedio de 10,1 ± 2,9 kg. Los corderos se encontraban divididos por sexo en sus corrales respectivos, todos fueron identificados individualmente por medio de collares y placas de aluminio. El espacio por animal fue de 1,3 m^2.

Alimentación

Los animales fueron alimentados con heno molido (49,6 % de Proteína Cruda (PC)) y alimento concentrado (Maíz molido 18,9% PC, pasta de soya 11,3% PC, melaza 17,6% PC, minerales 1,6% y urea 1%) administrados en dos ocasiones (en la mañana y al medio día) en cantidad calculada para una ganancia diaria de peso de 125 gramos durante el periodo de estancia en corrales. La dieta fue formulada con el programa AFRC (Sandoval-Castro, AFRC, 1993). La administración de agua fue ad libitum.

Manejo

Los animales fueron mantenidos libres de nemátodos gastrointestinales (NGI) durante todo el período de estudio mediante desparasitación con Sulfóxido de Albendazol 5mg/kg PV y Levamisol 7,5 mg/kg PV al inicio del estudio. Corroborando el estatus libre de infección por NGI mediante muestreo individual de heces cada 15 días para su examen coproparasitoscópico mediante la técnica de flotación y recuento de huevos por gramo de heces (H.P.G.) y la técnica modificada de McMaster (Torres-Acosta et al, 2015). Los animales fueron pesados en báscula electrónica cada dos semanas para ajustar las cantidades de alimento ofrecidas acorde a las ganancias de peso esperadas.

Se registraron durante los mismos días de observación la presencia o ausencia de: a) lagañas, implica que uno o ambos ojos presenten secreción excesiva de color blanquecina, amarillenta o verdosa que puede abarcar el área circundante, disminución de la fisura palpebral y la conjuntiva irritada; b) secreción nasal excesiva en uno o ambos ollares de color transparente a verde, las fosas nasales se encuentran húmedas, también moco seco; c) claudicación de uno o más miembros, en este el apoyo del peso es desigual en lo miembros y la longitud de la zancada es desigual.

Etograma

Se efectuaron observaciones diarias durante nueve días en todos los animales a las 2 de la tarde al menos una hora después de ofrecido el alimento. Con el fin de contrastar la frecuencia observada en la estabulación, tras dos días posteriores se observaron las expresiones faciales y posturas corporales en los mismos animales tras la oferta de una galleta durante 5 días, las observaciones fueron realizadas en el mismo horario empleado previamente. Se utilizó la Tabla 1, elaborada a partir de los trabajos de

McLennan et al. (2016), Häger et al. (2017) y Manteca et al. (2017) para el análisis de las conductas y expresiones faciales de los animales de estudio.

Tabla 1. Etograma de conductas y expresiones faciales relativas al disconfort o dolor. Nota: a indica que la conducta y/o expresión se considera como neutra, b indica que se considera como asociada a disconfort o dolor.

Indicador	Conducta	Descripción
Acción	Posición encorvada (Pe)	El sujeto se encuentra encogido con el lomo curveado hacia arriba[b].
Acción	Muerde pelo (Mp)	Arranca el pelo de otros corderos en una o más ocasiones[b].
Acción	Muerde cosas (Mc)	Muerde objetos como su bebedero, traste de comida, enrejado del corral por un segundo o más[b].
Acción	Bruxismo (Br)	Emisión de sonido realizado al ejercer fuerza y presionar la dentadura superior e inferior entre sí y de lado a lado, solo si no es acompañado de rumia[b].
Expresión facial	Perfil del labio y mandíbula (Pl)	1: El perfil de la mandíbula al labio sobre el masetero se observa recto[a]. 2: El perfil de la mandíbula al labio sobre el masetero se observa hundido[b].
Expresión facial	Posición de las orejas (Po)	1: Las orejas se encuentran horizontales en posición anatómica, y el pabellón con vista frontal[a]. 2: Las orejas se encuentran flácidas en rotación con el pabellón hacia ventral y caudal total o parcialmente[b].
Expresión facial	Apertura de los ojos (Ao)	1: La apertura del ojo entre las fisuras palpebrales permite ver más de 40° del globo ocular[a]. 2: Se presenta un estrechamiento del ojo, la fisura palpebral se encuentra disminuida por el cierre de los párpados[b].
Expresión facial	Forma de los ollares nasales con respecto a la boca (Oll)	1: En forma de u[a]. 2: En forma de v discreta o explícita[b].

Análisis descriptivo

Se realizó un análisis descriptivo de las frecuencias observadas por día, así como de las conductas más frecuentemente presentadas por los corderos en estabulación. Se comparó la frecuencia de expresiones faciales neutras con las de connotación de disconfort, mediante la Prueba Exacta de Fisher mejor adaptada para los casos en que existen pocos datos por celdas (Díaz y Ríos, 2018) y la prueba Chi 2 para la comparación de las expresiones faciales neutras y con connotación de disconfort antes y después de ofrecer a los animales una galleta a manera de estímulo positivo (Pértega, 2004; Amat, 2016). Todos los análisis fueron efectuados utilizando el programa estadístico R Studio (R core team, 2009).

Resultados

Validación de las buenas condiciones de alojamiento y manejo

Durante el período de observación de las conductas ningún animal resultó con presencia de lagañas, secreción nasal ni claudicación. Así mismo, la ganancia diaria de peso durante el período de estabulación

fue de 125 g conforme lo previsto acorde al plan nutrimental ofrecido a los animales. De igual forma los análisis coproparasitoscópicos resultaron negativos a NGI.

Estadística descriptiva de las conductas observadas

En la Tabla 2 se presenta el total de conductas observadas en base al Etograma utilizado durante los nueve días en que los corderos estabulados fueron monitoreados. La acción de Morder Cosas (Mc) parece presentarse con una frecuencia acumulada mayor. En cuanto a las expresiones faciales, es la Forma de los ollares nasales con respecto a la boca (Oll) la que tuvo una frecuencia acumulada mayor.

Tabla 2.Condensado de frecuencia acumulada de conductas. Acciones (Pe, Mp, Mc, Rd) y expresiones faciales (PC[1,2]; Po[1,2]; Ao[1,2];Oll[1,2]) en corderos estabulados por día de observación y por tipo de conducta. Pe: posición encorvada, Mp: muerde pelo, Mc: muerde cosas, Br: bruxismo, Pl: perfil del labio y mandíbula, Po: posición de las orejas, Ao: apertura de los ojos, Oll: forma de los ollares nasales con respecto a la boca.: 1 indica que la conducta y/o expresión se considera como neutra, 2 indica que se considera como asociada a disconfort o dolor.

	DÍA									
CÓDIGO	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**TOTAL**
Pe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp	2	5	7	3	10	7	7	6	7	54
Mc	4	4	1	1	7	12	9	11	6	55
Br	0	0	0	0	2	1	0	0	0	3
Pl[1]	42	39	39	41	40	42	42	42	42	369
Pl[2]	0	3	3	1	2	0	0	0	0	9
Po[1]	41	41	41	39	40	40	40	40	39	361
Po[2]	1	1	1	3	2	2	2	2	3	17
Ao[1]	42	42	42	41	41	40	42	41	42	373
Ao[2]	0	0	0	1	1	2	0	1	0	5
Oll[1]	38	34	37	21	40	41	41	39	39	330
Oll[2]	4	8	5	11	2	1	1	3	3	38
TOTAL	174	177	176	162	187	188	184	185	181	1614

El porcentaje de corderos que presentaron al menos una acción y al menos una expresión facial con connotación de disconfort (código terminando en 2) se muestran en la Tabla 3.

Considerando todo el período de observación (n=9 días) y a todos los animales observados (n=42), se sacó el porcentaje de animales que, en al menos una ocasión, presentaron una acción vinculada a disconfort, con un total de 83,3%. Y en cuanto a las expresiones faciales, el porcentaje fue de 59,5%.

Tabla 3. Porcentaje de corderos que presentaron al menos una conducta con connotación de disconfort.

	Acciones (%)	**Expresiones (%)**
Día 1	14,3	9,5
Día 2	19	23,8
Día 3	19	16,7
Día 4	16,7	31
Día 5	38,1	9,5
Día 6	38,1	9,5
Día 7	35,7	7,1
Día 8	35,7	11,9
Día 9	26,2	11,9
TOTAL	26,9	14,5
D. Estándar	9,9	7,9

Considerando el promedio de acciones y expresiones faciales expresadas por día, el porcentaje de animales fue de 26,9 (± 9,9) y de 14,5 (± 7,9) para las expresiones faciales.

Considerando el promedio de acciones y expresiones faciales expresadas por día y por individuo, resultó en que cada cordero presentó al menos una acción vinculada a disconfort durante los nueve días con una frecuencia promedio de 0,64 (±,23) y de 0,34 (±,18) para las expresiones faciales.

La comparación de las frecuencias observadas de expresiones faciales neutras (códigos con super índice 1 en la Tabla 2) con las de connotación de disconfort (códigos con super índice en 2 en la Tabla 2) durante los nueve días observados se presenta en la Tabla 4. En esta se aprecia que la frecuencia de expresiones faciales neutras es mayor que las de disconfort (P<0,001). Así mismo entre los cuatro tipos de expresiones la de mayor frecuencia fue la forma de los ollares nasales con respecto a la boca y la de menor frecuencia la apertura de los ojos.

Tabla 4.Frecuencia de expresiones faciales con connotación neutra y disconfort. Período de 9 días en estabulación.

	Neutras	**Disconfort**	**TOTAL**
Pc	369	9	378
Po	361	17	378
Ao	373	5	378
Oll	340	38	378
SUBTOTAL	1443	69	1512
Valor P		4.801e-08	

Comparación de expresiones faciales en estancia vs después de galleta

Durante los últimos cinco días de observaciones se compararon las expresiones faciales neutras (códigos con super índice 1) y con connotación de disconfort (códigos con super índice 2) antes y después de ofrecer a los animales una galleta a manera de estímulo positivo. Los resultados de las frecuencias observadas se muestran en la Tabla 5. Se puede observar que las expresiones neutras fueron mayores (p<0,05) antes de la oferta, en tanto que las expresiones de disconfort fueron menores después de ofrecer el estímulo positivo.

Tabla 5.Frecuencia de expresiones faciales de connotación neutra y de disconfort antes y después de la oferta de galleta.

	Neutras	*Disconfort*	*TOTAL*
Pre oferta	724	116	840
Post oferta	759	81	840
Subtotal	1483	197	1680
Valor *P*		0,009929	

Discusión

Ausencia de infección por NGI y de saciedad.

La desparasitación profiláctica aplicada al inicio del período experimental tal como lo menciona González-Garduño, (2011) y Zapata-Graza, (2017) funcionó, lo que fue corroborado en los muestreos de heces para análisis por flotación y McMaster los cuales resultaron negativos en todo el período.

Además, el ofrecimiento de forrajes de corte de áreas sin pastoreo de rumiantes, la recolección constante de heces, el desecamiento en los corrales por el asoleadero y el estado nutricional óptimo contribuyeron a mantener a los animales libres de infección de NGI.

El control de NGI contribuyó a mantener a los animales experimentales libres de enfermedades y considerando las condiciones de alojamiento, con asoleadero, sombra y el espacio recomendado por cabeza se puede afirmar que se mantuvieron en buenas condiciones de alojamiento y cumpliendo al menos cuatro (libres de hambre, sed y desnutrición; libres de temor y angustia; libres de molestias físicas y térmicas; libres de dolor, lesión y enfermedad) de las cinco libertades enunciadas por la OIE.

De manera empírica se pudo observar una ausencia en la saciedad de los corderos que, a pesar de recibir los requerimientos nutricionales óptimos mediante el concentrado logrando alzar el peso esperado, se presume la ración de forraje era menor para cubrir el volumen necesario para la sensación de saciedad (Romero y Bravo, 2012; Tarazona et al., 2012)

Baja frecuencia de acciones y expresiones faciales (EF) de disconfort

De acuerdo con las Tablas 2 y 3, las acciones y EF vinculadas a disconfort presentaron valores nominales bajos (muchos ceros y valores bajos de frecuencias (2-3)) en comparación con el resto de las otras conductas observadas. También en la Tabla 4 se presenta evidencia de una baja frecuencia de acciones y EF de disconfort con la prueba estadística de la chi cuadrada la cual resulto significativa (p<0,05). Todo lo anterior puede considerarse una confirmación de las buenas condiciones de alojamiento en las que se encuentran los corderos. Esto es cuando las cinco libertades (OIE, 2021) y las condiciones de alojamiento como la densidad animal, el espacio de comederos o el ofrecimiento de agua como es sugerido por Cuellar et al., (2012) y Luer et al., (2012) son cumplidas, por lo que los animales al estar en comodidad presentan una baja frecuencia de acciones y EF relacionadas al disconfort, resultado que se observó en el presente trabajo.

Proporción de animales e individuos que expresan acciones y EF de disconfort

Los resultados obtenidos parecen sugerir que una gran proporción de animales presentaron al menos una vez alguna acción (83,3%) o EF (59,5%) vinculada a disconfort durante los nueve días observados lo que contrasta con los resultados obtenidos reflejo de las buenas condiciones de alojamiento.

Esto se puede explicar al ser estas conductas presentadas por distintos corderos durante el total de los nueve días. Por ello tal indicador al expresarlo por animal por día resulta en muy bajas frecuencias promedio (0,64 veces por animal por día de observación), ponderando el resultado de 20% de animales que por día presentaron alguna acción o EF vinculada a disconfort.

Este resultado implica que, si bien la mayoría de los animales van a presentar alguna acción o EF en algún momento del período observado, son pocos los animales que en un mismo día lo presentan, y la frecuencia por animal por día es muy baja. Nuevamente esto se relaciona con las condiciones suficientes de alimentación, ausencia de parasitismo y buen ambiente de alojamiento (Cuellar et al., 2012; Luer et al., 2012; AWIN, 2015; OIE, 2021).

Comparación de acciones y EF neutras y disconfort

En el presente estudio la oferta de una galleta se utilizó para recrear un contexto neutro (antes de la oferta) y uno positivo (después de la oferta). La frecuencia de EF neutras permaneció muy similar como efecto de la oferta de la galleta (724 vs 759 en pre y pos oferta) lo que parece indicar que las expresiones faciales serían poco reactivas a los estímulos positivos. Los trabajos que utilizan estímulos positivos para estimar su efecto en la conducta de los corderos son pocos, algunos como el de Reefman, et al., (2009) en el que al ofrecerles comida palatable se evaluó la postura de las orejas, las cuales se mantuvieron estables con poco rango de movimiento y caída de las orejas mínima, y de igual forma notó que ante estímulos positivos la atención será mínima, pero con circunstancias negativas la respuesta incrementa; en otro estudio de Reefmann et al., (2012) se indujeron estímulos negativos y positivos como grooming en ambientes positivos y negativos, concluyendo que en los positivos o ya conocidos la estimulación positiva tendrá reacciones mínimas.

Sin embargo, el estímulo de la galleta si resultó en una reducción de la frecuencia de EF relacionadas a disconfort (116 vs 81 en pre y pos oferta) lo que confirma que tales expresiones son sensibles a los estímulos positivos, lo que también concuerda lo concluido por Reefmann et al., (2012) que, en ambientes positivos la estimulación negativos puede presentar una disminución de emociones negativas. Ello podría sugerir que un animal ante un estado negativo podría reducir momentáneamente su disconfort al exponérsele a un estímulo positivo, sin embargo, más investigaciones son necesarias para conformar dicha hipótesis.

Conclusión

Se puede concluir que los ovinos en condiciones de estabulación óptima, presentan en mayoría acciones y expresiones faciales neutras. La presentación de emociones neutras ante estímulos positivos puede asociarse a la relación con el ambiente favorable en el que se encuentran, sin embargo, es necesaria la realización de más estudios basados en diferentes escenarios que nos permitan evaluar expresiones únicamente relacionadas con un bienestar hedónico.

Agradecimientos

Al CONACYT-México por el financiamiento para el proyecto de maestría Nitrogen retention in hair sheep lambs with a gradient of Haemonchus contortus infection del que fueron parte los animales experimentales.

Bibliografía

[dataset] Amat, R., J., 2016. Test estadísticos para variables cualitativas: test exacto de Fisher, chi-cuadrado de Pearson, McNemar, Q-Cochran. En: Estadística y Machine Learning con R. Creative Commons, 3-11.

Animal Welfare Indicators. (2015). AWIN welfare assessment protocol for sheep. AWIN. https://doi.org/10.13130/AWIN_sheep_2015

Cuéllar-Ordaz, J.A., Tórtora-Pérez, J., Trejo-González, A., Román-Reyes, P. (2012). La producción ovina Mexicana particularidades y complejidades. Editorial Ariadna, México, pp. 85-92.

González-Garduño, R., Córdova-Pérez, C., Torres-Hernández, G., Mendoza de Gives, P., Arece-García, J. (2011). Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. Vet. Mex., 42(2), 125-135.

Diaz, B., Ladislao, Ríos, F., (2018). El valor p. Interpretación, orígenes y su utilización actual. Rev. Arg. Ter. Int. 35 (3).

Häger, C., Biernot, S., Buettner, M., Glage, S., Keubler, L.M., Held, N., Bleich, E.M., Otto, K., Müller, C.W., Decker, S., Talbot, S.R., Bleich, A. (2017). The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep. PLoS ONE 12(4): e0175839. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175839

Manteca, X., Mainau E., y Temple, G. (2012). ¿Qué es el bienestar animal? Farm Animal Education Centre. FAWEC. 1.

Manteca, X., Temple, D., Mainau, E., Llonch, P. (2017). Assessment of pain in sheep. The farm animal welfare fact sheet. 17.

McLennan, M.K., Rebelo, C.J.B., Corke, M.J., Holmes, M.A., Leach, M.C., Constantino-Casas, F. (2016). Development of a facial expression scale using footrot and mastitis as models of pain in sheep. Appl. Anim. Behav. Sci. 176, 19-26. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.01.007.

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2021). Animal Welfare. En: Animal Health Code. OIE.

Pértega, D., S., Pita, F., S. 2004. Asociación de variables cualitativas. El test exacto de Fisher y el test de McNemar. Cad. Aten. Primaria. 11 (5), 304-308.

Reefmann, N., Butikofer-Kaszas, F., Wechsler, B., Gygax, L. (2009). Ear and tail postures as indicators of emotional valence in sheep. Appl. Anim. Behav. Sci. 118, 199–207.

Reefmann, N., Muehlemann, T., Wechsler, B., Gygax, L. (2012). Housing induced modo modulates reactions to emotional stimuli in sheep. Appl. Anim. Behav. Sci. 136 (2-4), 146-155. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.12.007

Romero, O. y Bravo, S.M. (2012). Alimentación y nutrición en los ovinos. Boletín INIA. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 245, 24-31.

Sandoval-Castro, C.A. (1993). Necesidades de energía y proteína metabolizable de los rumiantes según AFRC 1993. FMVZ-UADY.

Tarazona, A.M, Ceballos, M.C, Naranjo, J.F, Cuartas, C.A. (2012). Factores que afectan el comportamiento de consumo y selectividad de forrajes en rumiantes. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 25(3), 473-487.

Torres-Acosta, F., Chan-Pérez, J.I., López-Arellano, M., Rosado-Aguilar, J., Soberanes-Céspedes, N., Orantes-Neri, S., Alonso-Díaz, M.A., Martínez-Ibañez, F., Osorio-Miranda, J., Vargas-Magaña, J., Encalada-Mena, L. (2015). CHAPTER: 12 Diagnóstico de resistencia a los antiparasitarios en rumiantes. En: Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. AMPAVE-CONASA, México D.F.

Villegas-Aleksov, D. (2021). Hacia una teoría ética de animales humanos y no humanos. Rev. Bioet. Der. 51, 157-171.

Zapata-Garza, J.P. (2017). Evaluación de dos métodos (manejo y químico) para el control de nematodos gastronintestinales en ovinos y caprinos en pastoreo extensivo. TESIS DE LICENCITURA. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Estudio del porcentaje de inclusión de subproducto de alcachofa (brácteas) en dietas de cabras lecheras para una producción sostenible y circular

P. Monllor[1], R. Muelas[2], A. Roca[2], E. Sendra[1], J. Bueso[3], A. Atzori[4], J.R. Díaz[1] y G. Romero[1]

[1] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental. Universidad Miguel Hernández (CIAGRO – UMH) Ctra. de Beniel km 3,2, 03312 Orihuela, gemaromero@umh.es
[2] Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), 03312 Alicante, Spain; raquel.muelas@umh.es (R.M.); aroca@umh.es (A.R.)
[3] Departamento de Producción Animal y Salud Pública, Universidad Católica de Valencia (UCV), 46001 Valencia, Spain; joel.bueso@ucv.es (J.B.)
[4] Dipartamento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Sassari, 07100, Italy; asatzori@uniss.it (A.S.A.)

Resumen

La emergencia climática actual obliga a encontrar soluciones que mejoren los procesos de producción de alimentos que optimicen el consumo de recursos limitados (como el agua o el suelo) y reduzcan las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) derivados de su producción. El empleo de subproductos locales de la agricultura y la industria agroalimentaria para alimentación animal logra ambos objetivos a la vez que reduce los costes de producción ganaderos, permitiendo la producción sostenible de alimentos de alto valor biológico para el hombre. El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de la inclusión en la ración de cabras lecheras del subproducto de alcachofa ensilado (ESA) en tres niveles (25%, 40% y 60%, en base seca) sobre la producción, composición y calidad de la leche de cabras lecheras para determinar el nivel óptimo para la producción y el bienestar animal. Treinta y seis cabras lecheras de raza Murciano-Granadina en mitad de lactación se repartieron en cuatro grupos de características homogéneas de peso vivo, producción lechera y recuento de células somáticas (RCS). A cada grupo se le asignó una dieta (tratamiento): testigo (T) que consistía en una dieta convencional de heno de alfalfa y concentrado, y otros tres tratamientos donde cada uno de ellos incluía un nivel de inclusión de ESA: ESA25, ESA40 y ESA60. Las dietas se formularon para que fueran isoenergéticas e isoproteicas. Tras 15 de días de adaptación a los tratamientos, se realizaron tres muestreos con un intervalo semanal para registrar el consumo de alimento, peso vivo de los animales y producción lechera. También se recogieron muestras de leche para analizar composición, RCS, perfil mineral y lipídico. Se observaron escasas diferencias en el consumo de alimento que no causaron grandes efectos sobre la producción y calidad de la leche y el estado sanitario de los animales. Solo ESA60 presentó una ligera menor producción de leche (1,91 kg/día), sin diferencias relevantes en la composición y perfil mineral de la leche. En cuanto al perfil lipídico, ESA40 fue el tratamiento que mejor calidad de leche presentó, debido a un mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados (4,37%) y menores Índices de Aterogenicidad (1,90) e Índice de Trombogenicidad (3,05), sin diferencias con el tratamiento testigo. Es por ello que se concluye que el máximo nivel de inclusión de ensilado de subproducto de alcachofa en dietas de caprino lechero es del 40%.

Palabras clave: perfil lipídico, CLA, perfil mineral, ensilado

Study of the inclusion of artichoke byproducts (bracts) in the dairy goats diet for a sustainable and circular production

Abstract

The current climate emergency means that solutions must be found to improve food production processes that optimise the consumption of limited resources (such as water and soil) and reduce greenhouse gas (GHG) emissions from their production. The use of local by-products from agriculture and the agri-food industry for animal feed achieves both objectives while reducing livestock production costs, enabling the sustainable production of food with high biological value for humans. The aim of this experiment was to study the effect of including ensiled artichoke by-product (ESA) in the ration of dairy goats at three levels (25%, 40% and 60%, dry

basis) on milk production, composition and quality, of dairy goats to determine the optimal level for production and animal welfare. Thirty-six mid-lactation dairy goats of the Murciano-Granadina breed were divided into four groups of homogeneous live weight, milk production and somatic cell count (SCC) characteristics. Each group was assigned a diet (treatment): control (T) consisting of a conventional diet of alfalfa hay and concentrate, and three other treatments where each of them included a level of ESA inclusion: ESA25, ESA40 and ESA60. The diets were formulated to be isoenergetic and isoproteic. After 15 days of adaptation to the treatments, three samplings were carried out at weekly intervals to record feed intake, live weight of the animals and milk production and quality. Milk samples were also collected to analyse composition, SCC, mineral and lipid profile. Little differences in feed intake were observed which did not cause major effects on milk yield or milk quality. Only ESA60 showed a slightly lower milk yield (1.91 kg/day), with no relevant differences in milk composition and mineral profile. As for the lipid profile, ESA40 was the treatment with the best milk quality, due to a higher content of polyunsaturated fatty acids (4.37%) and lower Atherogenicity Index (1.90) and Thrombogenicity Index (3.05), with no differences with the control treatment. It is therefore concluded that the maximum level of inclusion of artichoke by-product silage in dairy goat diets is 40%.

Keywords: lipid profile, CLA, mineral profile, silage

Introducción y/o Justificación

La alimentación del ganado caprino representa 50-65% de los costes de una explotación ganadera (Sánchez Rodríguez, 2014). Además, la producción de alimentos para uso ganadero comporta un consumo elevado de recursos naturales limitados, como tierra, agua y combustibles fósiles. También es frecuente que los ingredientes de las raciones de los animales tengan que recorrer largas distancias antes de acabar en la granja, con el consiguiente gasto y contaminación por transporte. Todo ello repercute negativamente en el sector de la producción animal, tanto de forma económica como a través del impacto sobre el medioambiente. Una solución a estos problemas es el aprovechamiento de subproductos locales para alimentación animal.

España es uno de los principales países productores de alcachofa a nivel mundial. La producción se concentra en la región sureste de la Península Ibérica, donde en 2018 se alcanzaron cifras superiores a 260.000 t (MAPA, 2019), siendo solo el 50% del total producido aprovechado para consumo humano, ya que el resto se compone de las brácteas, tallos y partes no comestibles (Ros *et al.,* 2012). Todo ello conlleva una gran disponibilidad de estos subproductos que pueden ser aprovechados mediante su utilización para alimentación animal.

En general, la composición de este subproducto es similar a la de las vainas de judías o al subproducto de espárragos, caracterizados por un contenido moderado de fibra neutro detergente (FND; 400-600 g/kg) y una concentración de proteína bruta (PB) media-alta (160-200 g/kg; García-Rodríguez et al., 2019), por lo que podría sustituir de forma parcial los forrajes y concentrados proteicos de la dieta, como la alfalfa o la torta de soja. El ensilado del subproducto de alcachofa (ESA) reúne las condiciones fermentativas adecuadas para asegurar una calidad nutritiva y de seguridad necesarias para formar parte de la ración de pequeños rumiantes (Meneses *et al*., 2020; Monllor *et al*., 2020a) a la vez que permiten su conservación durante periodos prolongados de tiempo (hasta 200 días según Monllor *et al.*, 2020a). Las referencias encontradas en la literatura acerca del efecto del consumo de ESA en la calidad y composición de la leche, así como en el estado sanitario de los animales son escasas (Marsico *et al*., 2005; Jaramillo *et al*., 2010; Salman *et al*., 2014). Solamente Monllor *et al.* (2020b) y Muelas *et al*. (2017) publicaron estudios acerca del empleo de ESA en caprino lechero, donde observaron que la inclusión de hasta un 25% en la dieta no tuvo efecto en el rendimiento y calidad de la leche y en las propiedades sensoriales del yogurt fabricado con la leche de esos animales. Además, la adición de subproductos agroindustriales en la dieta de rumiantes puede afectar al perfil lipídico de la leche (Liotta *et al.,* 2019; Campione *et al.,* 2020; Monllor *et al.,* 2020c; Nudda *et al.,* 2020), contribuyendo a la mejora de este por el incremento de PUFA como el ácido vaccénico y ruménico (Halmemies-Beauchet-Filleau *et al*., 2017).

El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de la inclusión de ESA en un 25, 40 y 60% en la ración de cabras lecheras de la raza Murciano-Granadina sobre la producción, composición y calidad de la leche y el estado sanitario de los animales, para así determinar el mejor nivel de inclusión de este subproducto sin perjudicar el rendimiento y salud de los animales.

Material y Métodos

Animales e instalaciones

Se emplearon cabras de raza Murciano-Granadina en lactación alojadas en la granja docente y experimental de la Universidad Miguel Hernández, con cama de paja, acceso a patios exteriores, libre acceso a agua y un espacio de comedero suficiente para todos los animales (al menos 35 cm/animal) en el interior. Los animales eran alimentados dos veces al día, a las 8:00 y 14:00, y se ordeñaban una vez al día (sala de ordeño tipo Casse, 2x12x12, GEA, Alemania), como es habitual en la región.

Diseño experimental

A partir de un grupo de 100 cabras que se encontraban a mitad de lactación (cuarto mes) alimentadas con una dieta convencional (testigo, T), se realizó un muestreo pre-experimental de todas las variables y se seleccionaron 36 animales, con un peso vivo (PV) medio de 41.9±6.24 kg, una producción media de 2.25±0.71 kg/día y un recuento de células somáticas (RCS) de 5.63±0.39 Log cél/mL. Los animales se dividieron en cuatro grupos de características homogéneas en cuanto a las variables comentadas.

Se realizó un experimento a corto plazo para estudiar el efecto de la inclusión en la ración de ESA en tres niveles: 25% (ESA25), 40% (ESA40) y 60% (ESA60), expresado en base seca del total de la ración. Todas las raciones se calcularon de acuerdo con las recomendaciones de formulación de Fernández *et al*. (2003), siendo el nivel de ingestión calculado de 2.2 kg MS/día, de forma que las cuatro raciones fueran isoenergéticas e isoproteicas. En la Tabla 1 se muestran las cantidades de los ingredientes presentes en cada dieta, así como la composición de las mismas. El experimento tuvo una duración de cuatro semanas. Las primeras dos semanas sirvieron de fase de adaptación a las dietas y, en las siguientes dos semanas, se llevaron a cabo tres controles donde se registró la ingestión de alimento, PV y producción de leche, además de la recogida de muestras de leche para su posterior análisis en laboratorio.

Variables analizadas

El PV de los animales (kg) se determinó mediante pesado con una báscula con precisión de 100 g (APC, Baxtran, España).

La composición de las raciones se determinó sobre muestra deshidratada a 60 ºC de acuerdo con los procedimientos recogidos en AOAC (1999) para materia seca (MS, g/kg; método 930.5), materia orgánica (MO, g/kg MS; método 942.05), extracto etéreo (EE, g/kg MS; método 920.39) y PB (g/kg MS; método 984.13). Los contenidos en FND (g/kg MS), fibra ácido detergente (FAD, g/kg MS) y lignina ácido detergente (LAD, g/kg MS) se analizaron según el método de Van Soest *et al.* (1991). El contenido en polifenoles totales (PT, g/kg MS) presentes en las raciones se analizó mediante el método de Folin-ciocalteu recogido en Kim *et al.* (2003) sobre muestras en fresco. La determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV) como ácido acético, propiónico y butírico, además de otros metabolitos de la fermentación del ensilado, como el ácido láctico y el etanol, se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Feng-Xia et al. (2013), utilizando cromatografía líquida de HPLC (Agilent 1200, Santa Clara, CA, EEUU), con una columna C610H de 30 cm y 7,8 mm DI (Supelcogel, Saint Louis, MO, EEUU) sobre muestras frescas raciones. La digestibilidad aparente in vitro de materia seca (IVDMD, g/kg MS) se analizó por duplicado mediante el método de Menke y Steingass (1988). El análisis del perfil de ácidos grasos en las dietas se realizó mediante metilación directa sobre las muestras liofilizadas, sin previa extracción de la grasa, según Kramer *et al*. (1997), utilizando como patrón interno C19:0 metilado (Sigma-Aldrich, USA). La identificación y cuantificación de los ésteres de ácidos grasos metilados (FAME) se realizó con un detector de ionozación de llama (FID) acoplado a un cromatógrafo de gases GC-17A (Shimadzu, Kioto, Japón), equipado con una columna CP Sil 88 de 100 m, 0,25 mm

de DI y 0,20 mm de cobertura interna (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU). Como patrones, se utilizó un mix de ésteres de ácidos grasos metilados (18912-1AMP, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU). El consumo de alimento se calculó por diferencia del alimento ofrecido y rehusado, determinando la materia seca mediante deshidratación en estufa a 105 ºC durante 48 h de una muestra representativa del alimento rehusado por los animales de cada tratamiento.

Para el análisis de minerales de las dietas y de leche, se realizó una digestión previa de las muestras según González Arrojo *et al.* (2016). Se utilizó un equipo ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) Agilent 7700x (Santa Clara, CA, EEUU) ORS (Octapole Reaction System) para determinar las concentraciones de Na, Mg, K, Ca, P, S, Se, Zn, Cu, Fe y Mn. Se utilizó un patrón interno para corregir las interferencias físicas y/o de matriz del equipo ICP-MS.

La producción lechera de las cabras se midió con un dispositivo Lactocorder (WMB, Balgach, Suiza) acoplado al tubo largo de leche del equipo de ordeño. El mismo Lactocorder también recogía 100 mL de muestra de leche representativa de todo el ordeño de cada animal, para el posterior análisis de RCS y macrocomposición. El RCS de las muestras de leche se determinaba mediante un equipo DCC (Delaval Cell Counter, DeLaval, Tumba, Suecia), utilizando un método electrónico fluoro-óptico. Los resultados se transformaron a Log_{10} (LRCS) con la finalidad de normalizar la variable para el análisis estadístico. El análisis de la macrocomposición y contenido en urea de las muestras de leche realizó mediante un equipo de espectroscopía de infrarrojo medio (MilkoScan FT2, FOSS, Hillerød, Denmark), calibrado para leche de cabra. Las variables analizadas fueron: grasa, proteína, proteína verdadera, caseína, proteína del suero, lactosa, sólidos totales (ST), extracto seco magro (ESM), extracto seco útil (grasa + proteína, ESU), cenizas y urea. Se calculó la producción de leche corregida por grasa, según la ecuación de Gravert (1987): FCM (3.5%) = 0.433 x Producción (kg/día) + 16.218 x Producción de grasa (kg/día), y la producción de leche corregida por grasa y proteína, FPCM = Producción (kg/día) x (0,337 + 0,116 x Grasa (%) + 0,06 x Proteína (%) (Schau y Fet, 2008).

El análisis del perfil de ácidos grasos de la leche se realizó mediante una extracción de la grasa por el método Folch con algunas variaciones, tal y como se detalla en Romeu-Nadal *et al*. (2004). Los ácidos grasos fueron metilados según el método de Nudda *et al*. (2005). El equipo, columna y mix de patrones de ácidos grasos fueron los descritos anteriormente en el análisis del perfil lipídico de las muestras de raciones. Se calcularon los Índices de Aterogenicidad (IA) y Trombogenicidad (IT), de acuerdo con Ulbricht y Southgate (1991), y los Índices de Desaturación (ID) para el C14:0, C16:0 y C18:0, según Lock y Garnsworthy (2003). El método de análisis de minerales de las muestras de leche fue el mismo que el utilizado en muestras de ensilados y raciones.

Análisis estadístico

Las variables se analizaron de acuerdo a un modelo lineal mixto con medidas repetidas (PROC GLIMMIX. SAS v9.2, 2012), introduciendo en el modelo la covariable de los datos obtenidos en el muestreo pre-experimental, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Y = \mu + D_i + M_j + D_i x M_j + covY_0 + A_k + e,$$

Donde Y es la variable dependiente, μ es el intercepto, D_i es el efecto fijo de la dieta (i=T, ESA25, ESA40, ESA60), M_j es el efecto fijo del muestreo (j= 1, 2, 3), $D_i x M_j$ es la interacción de la dieta con el muestreo, $covY_0$ es el efecto del valor de Y en el muestreo 0, A_k es el efecto aleatorio del animal y e el error residual. Para cada variable se empleó el modelo de covarianza que presentó una mejor modelización de los datos (menor AIC y BIC). La variable RCS fue transformada en logaritmo para normalizar la variable.

Tabla 1. Ingredientes y composición química de las dietas experimentales.

Variable	Dietas			
	T	ESA25	ESA40	ESA60
Ingredientes (g/100 g MS)				
Heno de alfalfa	37,5	13,2	4,83	-
Mix de granos[1]	62,5	61,8	55,8	29,0
Avena	-	-	-	10,2
Silo	-	24,7	38,7	60,0
Premix vitaminas/minerales	-	0,311	0,696	0,880
Composición química				
Materia Seca (g/kg MF)	872	422	322	231
g/kg MS				
Materia Orgánica	932	936	936	920
Extracto Etéreo	65,3	57,72	58,53	48,85
Proteína Bruta	162	160	157	145
Fibra Neutro Detergente	399	321	371	459
Fibra Acido Detergente	218	183	205	294
Lignina Acido Detergente	63,1	40,8	36,2	116
Polifenoles Totales	3,87	7,95	7,75	14,7
dMS (g/kg MS)	715	739	804	769
[2]Energía Metabolizable (Mcal/kg MS)	2,66	3,13	2,51	2,44
AGV y productos de fermentación (g/kg MS)				
Láctico	n.d.	3,99	23,5	3,66
Acético	n.d.	2,63	3,12	8,74
Propiónico	n.d.	3,70	n.d.	n.d.
Butírico	n.d.	9,80	n.d.	23,7
Etanol	n.d.	2,49	4,13	8,85
NH_3 (g N-NH_3/kg N_T)	0,680	4,01	4,01	8,95
Perfil de ácidos grasos (g/100g ácidos grasos totales)				
SFA	23,3	30,5	23,9	45,1
MUFA	28,2	25,0	29,1	20,3
PUFA	48,7	44,5	47,2	34,8
Minerales				
Na (g/kg MS)	2,89	2,59	3,28	3,11
Mg (g/kg MS)	2,66	2,57	2,62	2,86
K (g/kg MS)	13,5	17,7	19,7	23,5
Ca (g/kg MS)	5,90	6,24	5,64	5,33
P (g/kg MS)	2,76	3,95	3,64	4,00
S (g/kg MS)	2,89	2,94	2,71	2,89
Se (mg/kg MS)	0,198	0,288	0,119	0,100
Zn (mg/kg MS)	49,4	73,8	55,4	46,5
Cu (mg/kg MS)	6,15	7,42	6,63	8,20
Fe (mg/kg MS)	129	230	133	160
Mn (mg/kg MS)	42,1	51,5	31,7	28,3

T: dieta testigo; ESA: dieta que incluye ensilado de subproducto de alcachofa en un 25, 40 o 60%; dMD: digestibilidad *in vitro* de la materia seca; EM: energía metabolizable; AGV: ácidos grasos volátiles; N_T: nitrógeno total; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; n.d.: no detectado.

[1]El mix de granos estaba compuesto por granos de cereales, semillas oleaginosas y pellets de concentrado. [2]INRA (1988)

Resultados

Peso vivo y rendimiento lechero

Las cabras del lote T presentaron incremento de PV a lo largo del experimento que causó un valor medio superior (p<0,05) que los de los lotes ESA, sin que se dieran diferencias entre estos dos, como se observa en la Tabla 2. El consumo de alimento fue similar en todos los lotes, aunque ligeramente superior en T (2,21 ± 0,006 kg MS/día).

La producción de leche fue menor (p <0,05) en los animales alimentados con mayor nivel de inclusión de ESA, sin que existieran diferencias entre T y ESA25 y ESA40. De igual forma, FCM y FPCM también presentaron un valor más bajo en ESA60 (p <0,05). Respecto a la macro-composición de la leche, solo se hallaron diferencias significativas, aunque de escasa magnitud, en el contenido en cenizas (p <0,05), siendo ESA25 el que presentó un valor superior (0,656%) y ESA60 el menor (0,568%). La inclusión de ESA en la dieta de cabras lecheras no afectó al contenido de urea en leche (p >0,05).

Tabla 2. Resultados de la comparación de medias de las variables peso vivo, ingestión, producción, RCS y composición de la leche según los efectos considerados.

Variable	Dietas					Significación		
	T	ESA25	ESA40	ESA60	SEM	Dieta	Muestreo	Dieta x Muestreo
Peso vivo medio (kg)	44,2a	42,4b	42,3b	42,2b	0,565	*	*	***
Producción (kg/día)	2,39a	2,33a	2,26ab	1,91b	0,139	*	ns	*
LRCS (Log_{10} cél/mL)	5,57	5,71	5,58	5,59	0,103	ns	**	ns
FCM (kg/día)	2,55a	2,46ab	2,50a	2,00b	0,163	*	ns	ns
Grasa (%)	3,74	3,97	4,04	4,20	0,205	ns	ns	ns
Proteína (%)	3,35	3,33	3,40	3,41	0,079	ns	ns	ns
FPCM (kg/día)	2,37a	2,30a	2,30a	1,87b	0,142	*	ns	ns
Extracto seco útil (%)	7,12	7,31	7,44	7,57	0,223	ns	ns	*
Proteína verdadera (%)	3,12	3,10	3,16	3,17	0,070	ns	ns	ns
Caseína (%)	2,66	2,64	2,73	2,70	0,062	ns	ns	ns
Proteína del suero (%)	0,462	0,470	0,433	0,457	0,018	ns	**	**
Lactosa (%)	4,24	4,22	4,33	4,25	0,045	ns	*	***
Materia seca (%)	12,0	12,2	12,4	12,3	0,227	ns	ns	ns
Extracto seco magro (%)	8,72	8,72	8,84	8,71	0,099	ns	ns	*
Cenizas (%)	0,618ab	0,656a	0,598ab	0,568b	0,032	*	ns	ns
Urea (mg/L)	597	549	533	542	24,4	ns	ns	ns

T: dieta testigo; ESA: dieta que incluye ensilado de subproducto de alcachofa en un 25, 40 o 60%; SEM: error estándar de la media; LRCS: logaritmo en base 10 de recuento de células somáticas; FCM: producción de leche corregida por grasa (3.5%); FPCM: producción de leche corregida por grasa y proteína. abc: diferentes letras dentro de una misma variable indican diferencias significativas entre lotes. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s.= no significativa.

Perfil mineral de la leche

Como se observa en la Tabla 3, solo se hallaron diferencias de escasa magnitud en el contenido en Mn de la leche, siendo la leche de ESA40 y ESA60 los que mayor nivel presentaron (p<0,05).

Tabla 3. Resultados de la comparación de medias del contenido mineral en leche, según los efectos considerados.

Variable	Dietas					Significación
	T	ESA25	ESA40	ESA60	SEM	Dieta
Na (g/kg MS)	2,59	2,44	2,50	2,96	0,314	ns
Mg (g/kg MS)	0,888	0,896	0,864	0,921	0,069	ns
P (g/kg MS)	6,00	5,98	6,38	5,91	0,437	ns
S (g/kg MS)	2,45	2,43	2,60	2,41	0,118	ns
K (g/kg MS)	12,0	12,5	11,4	11,5	0,724	ns
Ca (g/kg MS)	8,85	8,79	8,87	8,39	0,533	ns
Mn (mg/kg MS)	0,203b	0,236b	0,328a	0,316a	0,017	**
Fe (mg/kg MS)	2,95	2,27	2,72	2,34	0,304	ns
Cu (mg/kg MS)	0,697	0,522	0,474	0,378	0,066	ns
Zn (mg/kg MS)	28,3	23,3	25,9	21,3	3,54	ns
Se (mg/kg MS)	0,102	0,104	0,112	0,094	0,009	ns

T: dieta testigo; ESA: dieta que incluye ensilado de subproducto de alcachofa en un 25, 40 o 60%; SEM: error estándar de la media. abc: diferentes letras dentro de una misma variable indican diferencias significativas entre lotes. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,0001; n.s.: no significativa

Perfil lipídico de la leche

El perfil lipídico de la leche de los animales del presente experimento se encuentra detallado en la Tabla 4. Se observó un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en la leche de las cabras alimentadas con las dietas T y ESA40 (Tabla 4; p <0,05). Respecto a los índices relacionados con la calidad del perfil lipídico en cuanto a la prevención de enfermedades cardiovasculares, ESA40 presentó una mayor calidad por tener menores valores de IA e IT (1,90 y 3,05, respectivamente. p <0,05). Tanto ESA40 como ESA60 presentaron mayor actividad de desaturación de los ácidos grasos de 18 carbonos (p <0,001).

Tabla 4. Resultados de la comparación de medias de los grupos de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos totales), índices de calidad de salud cardiovascular y de actividad de desaturación medidos en leche, según las dietas.

Variable	Dietas					Significación
	T	ESA25	ESA40	ESA60	SEM	Dieta
SFA	72,5	73,3	72,1	72,7	1,80	ns
MUFA	23,5	22,0	23,1	23,0	2,23	ns
PUFA	4,13ab	3,93b	4,37a	3,53c	0,192	*
UFA	27,3	26,1	27,4	26,7	1,86	ns
SFA/UFA	2,65	2,83	2,68	2,74	0,255	ns
SCFA	23,1	25,6	27,1	24,8	3,57	ns
MCFA	36,4	34,2	33,4	36,7	1,44	ns
LCFA	39,9	40,1	39,2	37,9	2,77	ns
OBCFA	2,84	2,51	2,67	2,84	0,128	ns
Σ CLA	0,596	0,543	0,592	0,505	0,117	ns
n3	0,179	0,145	0,153	0,136	0,011	ns
n6	2,80a	2,77ab	3,06a	2,44b	0,173	*
n6/n3	16,1	19,2	20,2	18,7	1,16	Ns
AI	2,07a	2,09a	1,90b	2,10a	0,080	**
TI	3,26ab	3,36a	3,05b	3,29ab	0,154	**
C14:1/C14:0	0,009	0,007	0,009	0,011	0,002	Ns
C16:1/C16:0	0,051	0,041	0,050	0,045	0,004	Ns
C18:1/C18:0	1,56b	1,47b	1,66ab	1,78a	0,106	***

T: dieta testigo; ESA: dieta que incluye ensilado de subproducto de alcachofa en un 25, 40 o 60%; SEM: error estándar de la media, SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; UFA: ácidos grasos insaturados (MUFA + PUFA); SCFA: ácidos grasos de cadena corta (C6:0 a C10:0); MCFA: ácidos grasos de cadena media (C11:0 a C17:0); LCFA: ácidos grasos de cadena larga (C18:0 a C24:0); OBCFA: ácidos grasos de cadena ramificada; CLA: ácidos linoleico conjugado; AI: índice de aterogenicidad; TI: índice de trombogenicidad.

Discusión

Peso vivo y rendimiento lechero

Las dietas que incluían ESA presentaron un ligero menor consumo de alimento que puede ser explicado por la presencia de metabolitos de fermentación en estas dietas y a un mayor contenido en PT (Tabla 1), los cuales reducen la ingestión de alimento (Huhtanen *et al*., 2007; Decandia *et al*., 2000). Otro factor que pudo afectar fue el mayor volumen de la dieta, ya que la inclusión de ESA incrementó el contenido en humedad, al igual que ocurrió en Monllor *et al*. (2020c) con ensilados de subproducto de brócoli y planta de alcachofa en dietas de caprino lechero. Sin embargo, debido a que estas diferencias en el consumo de alimento fueron de escasa magnitud, las diferencias en PV no fueron relevantes.

Las escasas diferencias en el consumo de alimento tampoco afectaron a la producción de leche, ESA60 presentó un ligero menor valor de producción (1,91 kg/día), sin variar el contenido en grasa y proteína, lo que causó que FCM y FPCM fueran inferiores (p <0,05) en ESA60 con respecto a los otros tratamientos (2,00 y 1,87 kg/día).

Perfil mineral de la leche

Aunque ESA40 y ESA60 presentaron un nivel superior de Mn en la leche, estas diferencias respecto a T y ESA25 son biológicamente irrelevantes. El perfil mineral de la leche de las cabras utilizadas en experimento coincide con el expuesto por Stergiadis *et al*. (2019) para una leche típica de cabra.

Perfil lipídico de la leche

El grupo de ácidos grasos de cadena ramificada y cíclica (OBCFA) son biomarcadores de la actividad ruminal y cuentan con actividad potencial frente a enfermedades metabólicas (Pfeuffer y Jaudszus, 2016). El mayor contenido de OBCFA en la leche de cabra cuanto mayor era el consumo de ESA se debió a la mayor concentración de FND de estas dietas, lo cual según Patel *et al*. (2013) supone una mayor generación de AGV ruminales, que son precursores de la síntesis de estos ácidos grasos.

ESA40 fue el tratamiento que mejor perfil lipídico de la leche presentó. La mayor concentración de PT en esta dieta ayudó a alcanzar valores superiores de PUFA, debido al efecto inhibitorio sobre la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos (Correddu *et al*., 2019). Con todo esto, la leche de ESA40 mostró los menores IA e IT, lo que conlleva una mejor calidad frente a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Ganguly *et al*., 2018).

Conclusiones

La utilización del ensilado de subproducto de alcachofa en la dieta de cabras lecheras es una alternativa a considerar a nivel comercial dado su impacto favorable en la calidad de la leche. De los tres niveles de inclusión estudiados en este experimento, el del 40% fue el que supuso una mayor inclusión del subproducto sin penalizar la producción de leche con mayor contenido en PUFA y menores IA e IT. No obstante, se considera que es necesario realizar ensayos que incluyan este porcentaje durante periodos de tiempo mayores (lactación completa).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Consellería de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica, Generalitat Valenciana, 2020/VALORIZA/VSC/024.

Queremos agradecer a Aprovertia S.L., una empresa de base tecnológica de la UMH, el uso de sus instalaciones para elaborar los ensilados.

Bibliografía

AOAC. 1999. Official methods of analysis, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington.

Batista, A.L.D.; Silva, R.; Cappato, L.P.; Ferreira, M.V.S.; Nascimento, K.O.; Schmiele, M.; Esmerino, E.A.; Balthazar, C.F.; Silva, H.L.A.; MorESAs, J.; Pimentel, T.C.; Freitas, M.Q.; Raices, R.S.L.; Silva, M.C.; Cruz, A.G. 2017. Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. J. Funct. Foods, 38: 242-250.

Campione, A.; Natalello, A.; Valenti, B.; Luciano, G.; Rufino-Moya, P.J; Avondo, A.; Morbidini, L.; Pomente, C.; Krol, B.; Wilk, M.; Migdal, P.; Pauselli, M. 2020. Effect of Feeding Hazelnut Skin on Animal Performance, Milk Quality, and Rumen Fatty Acids in Lactating Ewes. Animals, 10(4), 588.

Correddu, F.; Fancello, F.; Chessa, L.; Atzori, A.S.; Pulina, G.; Nudda, A. 2019. Effects of supplementation with exhausted myrtle berries on rumen function of dairy sheep. Small Rumin. Res., 170: 51–61.

Decandia, M.; Sitzia, M.; Cabiddu, A.; Kababya, D.; Molle, G. 2000. The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in goats fed woody species. Small Rumin. Res., 38: 157–164.

Feng-Xia, L.; Shu-Fang, F.; Xiu-Fang, B.; Fang, C.; Xiao-Jun, L.; Xiao-Song, H.; Ji-Hong, W. 2013. Physico-chemical and antioxidant properties of four mango (Mangifera indica L.) cultivars in China. Food Chemistry, 138: 396–405.

Ferlay, A.; Bernard, L.; Meynadier, A.; Malpuech-Brugère, C. 2017. Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. Biochimie, 141: 107–120.

Fernández, C.; Sánchez-Séiquer, P., Navarro, M.J., Garcés, C. 2003. Modeling the voluntary dry matter intake in Murciano-Granadina dairy goats. 1st Joint seminar of the FAO-CIHEAM sheep and goat nutrition and mountain and Mediterranean pastures subnetworks. Granada, pp. 96.

Ganguly, R.; Hasanally, D.; Stamenkovic, A.; Maddaford, T.G.; Chaudhary, R.; Pierce, G.N.; Ravandi, A. 2018. Alpha linolenic acid decreases apoptosis and oxidized phospholipids in cardiomyocytes during ischemia/reperfusion. Mol. Cell. Biochem., 437: 163–175.

García-Rodríguez, J.; Ranilla, M.J.; France, J.; Alaiz-Moretón, H.; Carro, M.D.; López, S. 2019. chemical composition, in vitro digestibility and rumen fermentation kinetics of agro-industrial by-products. Animals, 9: 861.

Ghasemi, S.; Naserian, A. A.; Valizadeh, R.; Tahmasebi, A. M.; Vakili, A. R.; Behgar, M. 2012. Effects of pistachio byproduct in replacement of lucerne hay on microbial protein synthesis and fermentative parameters in the rumen of sheep. Anim. Prod. Sci., 52: 1052 – 1057.

González-Arrojo, A.; Soldado, A.; Vicente, F.; Fernández Sánchez, M.L.; Sanz-Medel, A.; de la Roza-Delgado, B. 2016. Changes on levels of essential trace elements in selenium naturally enriched milk. J. Food Nutr. Res. 4(5): 303-308.

Gravert, H.O. 1987. Dairy cattle production. New York: Elsevier Science. 234p.

Halmemies-Beauchet-Filleau, A.; Shingfield, K.J.; Simpura, I.; Kokkonen, T.; Jaakkola, S.; Toivonen, V. 2017. Effect of incremental amounts of camelina oil on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on a mixture of grass and red clover silage and concentrates containing camelina expeller. J.Dairy Sci. 100: 305-324.

Huhtanen, P.; Rinne, M.; Nousiainen, J. 2007. Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: A revision of the relative silage dry-matter intake index. Animal, 1: 758–770.

Jaramillo, D.P.; Buffa, M.N.; Rodríguez, M.; Pérez-Baena, I.; Guamis, B.; Trujillo, A.J. 2010. Effect of the inclusion of artichoke silage in the ration of lactating ewes on the properties of milk and cheese characteristics during ripening. J. Dairy Sci., 93: 1412–1419.

Kim, D.O.; Seung, W.J.; Lee, C.Y. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry, 81: 321–326.

Kramer, J. K. G.; Fellner, V.; Dungan, M.E.R.; Sauer, F.D.; Mossoba, M.M.; Yurawecz, M.P. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugates dienes and total trans fatty acids. Lipids, 32: 1219–1228.

Liotta, L.; Randazzo, C.L.; Russo, N.; Zumbo, A.; Di Rosa, A.R.; Caggia, C.; Chiofalo, V. 2019. Effect of Molasses and Dried Orange Pulp as Sheep Dietary Supplementation on Physico-Chemical, Microbiological and Fatty Acid Profile of Comisana Ewe's Milk and Cheese. Front. Nutr., 6, 1.

Lock, A.L.; Garnsworthy, P.C. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ9-desaturase activity in dairy cows. Livest. Prod. Sci., 79(1): 47-59.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (MAPA). 2019. Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE). https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/resultados-de-anos-anteriores/default.aspx

Marsico, G.; Ragni, M.; Vicenti, A.; Caputi Jambrenghi, A.; Tateo, A.; Giannico, F.; Vonghia, G. 2005. The quality of meat from lambs and kids reared on feeds based on artichoke (Cynara scolymus L.) bracts. Acta Hortic, 681: 489-494.

McMahon, L.; McAllister, T.; Berg, B.; Majak, W.; Acharya, S.; Popp, J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. Can. J. Plant. Sci., 80: 469–485.

Meneses, M.; Martínez-Marín, A.L.; Madrid, J.; Martínez-Teruel, A.; Hernández, F.; Megías, M.D. 2020. Ensilability, in vitro and in vivo values of the agro-industrial by-products of artichoke and broccoli. Environ. Sci. Pollut. R., 27: 2919–2925.

Menke, K.H.; Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research, 23: 103–116.

Monllor, P.; Romero, G.; Muelas, R.; Sandoval-Castro, C.A.; Sendra, E.; Díaz, J.R. 2020a. Ensiling process in commercial bales of horticultural by-products from artichoke and broccoli. Animals, 10: 831.

Monllor, P.; Romero, G.; Sendra, E.; Atzori, A.S.; Díaz, J.R. 2020b. Short-term effect of the inclusion of silage artichoke by-products in diets of dairy goats on milk quality. Animals, 10(2): 339.

Monllor, P.; Muelas, R.; Roca, A.; Atzori, A.S.; Díaz, J.R.; Sendra, E.; Romero, G. 2020c. Long-Term Feeding of Dairy Goats with Broccoli By-Product and Artichoke Plant Silages: Milk Yield, Quality and Composition. Animals, 10: 1670.

Nudda, A.; McGuire, M.; Battacone, G.; Pulina, G. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta. J. Dairy Sci., 88: 1311–1319.

Nudda, A.; Cannas, A.; Correddu, F.; Stanislao Atzori, A.S.; Lunesu, M.F.; Battacone, G.; Pulina, G. 2020. Sheep and Goats Respond Differently to Feeding Strategies Directed to Improve the Fatty Acid Profile of Milk Fat. Animals, 10: 1290.

Patel, M.; Wredle, E.; Bertilsson, J. 2013. Effect of dietary proportion of grass silage on milk fatwith emphasis on odd- and branched-chain fatty acids in dairy cows. J. Dairy Sci., 96: 390–397.

Pfeuffer, M.; Jaudszus, A. 2016. Pentadecanoic and Heptadecanoic acids: Multifaceted odd–chain fatty acids. Adv. Nutr., 7: 730–734.

Rivas, J.; Rossini, M.; Colmenares, O.; Salvador, A.; Morantes, M.; Valerio, D. 2014. Effect of feeding on the profile metabolic goats in canary in the tropics. In Proceedings of the 4th Simposium of the Latinomerican Asociation in Animal Science, Quevedo, Ecuador, 13–15 November 2014; pp. 125–132.

Romeu-Nadal, M.; Morera-Pons, S.; Casteltratamiento, A. I.; López-Sabater, M. C. 2004. Comparison of two methods for the extraction of fat from human milk. Anal. Chim. Acta, 513(2): 457-461.

Ros, M.; Pascual, J.A.; Ayuso, M.; Morales, A.B.; Miralles, J.R.; Solera, C. 2012. Estrategias sostenibles para un manejo integral de los residuos y subproductos orgánicos de la industria agroalimentaria. Proyecto LIFE+ Agrowaste. CEBAS-CSIC, CTC and AGRUPAL. España.

Salman, F.M.; El-Nomeary, Y.A.A.; Abedo, A.A.; Abd El-Rahman, H.H.; Mohamed, M.I.; Ahmed S.M. 2014. Utilization of artichoke (Cynara scolymus) by-products in sheep feeding. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 14 (7): 624-630.

Schau, E.M.; Fet, A.M. 2008. LCA studies of food products as background for environmental product declarations. Int. J. Life Cycle Assess., 13: 255–265.

Stergiadis, S.; Nørskov, N.P.; Purup, S.; Givens, I.; Lee, M.R.F. 2019. Comparative nutrient profiling of retail goat and cow milk. Nutrients, 11: 2282

Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary neutral detergent fibre and nonstarch polysacacharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci., 74: 3583–3597.

Sesión 5:

Agricultura Sostenible. Cambio Climático y Estreses Ambientales.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE CIANOBACTERIAS

M.P. Marí [1], A.D. Asencio[1], M.T. Pretel [2] y G. Díaz [1]

[1] Departamento de Biología Aplicada, Botánica, Universidad Miguel Hernández. Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Alicante. gdiaz@umh.es
[2] Departamento de Biología Aplicada, Fisiología Vegetal, Universidad Miguel Hernández. Carretera de Beniel, km 3,2, 03312 Orihuela, Alicante.

Resumen

Existe un creciente interés por parte de productores, industria agroalimentaria, farmacéutica y consumidores en la búsqueda de nuevos productos biotecnológicos naturales más sanos y respetuosos con el medio ambiente para tratar las micosis en los cultivos o para los tratamientos postcosecha. Las cianobacterias han demostrado ser buenas productoras de metabolitos secundarios con actividad antifúngica cuyo coste de producción es reducido, ya que no requieren condiciones especiales de cultivo. La mayoría de los trabajos de investigación se enfocan en ensayos con hongos patógenos para el ser humano, siendo pocos los estudios sobre su uso como alternativa a fungicidas convencionales en postrecolección. En este trabajo se presenta un método para evaluar la capacidad antifúngica de extractos de cianobacterias mediante test de difusión en disco. Se utilizaron extractos en acetona y etanol de ocho especies de cianobacterias: *Scytonema crispum, Scytonema* cf. *varium, Pseudocapsa dubia, Phormidium* sp., *Geitlerinema* sp., *Leptolyngbya* sp., *Plectonema* sp. y *Nostoc commune;* sobre siete especies de hongos que causan daños en postcosecha: *Alternaria* sp., *Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Sclerotinia* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora citrophthora* y *Rhizopus stolonifer*. Se ha optimizado un método para evaluar la capacidad tóxica de extractos de cianobacterias frente a hongos filamentosos en cuanto a los siguientes parámetros: protocolo de obtención de los extractos, extractante utilizado, densidad del inóculo fúngico y fungicida utilizado como control.

Palabras clave: Cianobacterias, hongos, extractos, postcosecha, test-difusión-disco

Optimization of a method to evaluate the antifungal activity of Cyanobacteria extracts

Abstract

There is growing interest by farmers, agro-food industry and consumers in searching for new, healthier and environmentally friendly natural biotechnological products to treat fungal diseases in crops or in post- harvest treatments. Cyanobacteria have demonstrated to be a source of secondary metabolites with antifungal activity whose production cost is low, since they do not require special culture conditions. Most of the research focuses on pathogenic fungi for humans, while there are few studies on their use as alternative fungicides in post-harvest. In this study, a method to evaluate the antifungal capacity of cyanobacteria extracts by means of disk diffusion test is presented. Acetone and ethanolic extracts of eight species of cyanobacteria (Scytonema crispum, Scytonema cf. varium, Pseudocapsa dubia, Phormidium sp., Geitlerinema sp., Leptolyngbya sp., Plectonema sp. and Nostoc commune) were used against seven species of fungi that cause postharvest damage (Alternaria sp. Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Sclerotinia sp., Fusarium sp., Phytophthora citrophthora, and Rhizopus stolonifer). A method has been optimized to evaluate the toxic activity of cyanobacterial extracts against filamentous fungi in terms of the following parameters: method for obtaining the extracts, the extractant used, the density of the fungal inoculum and the fungicide used as control.

Keywords: Cyanobacteria, fungi, extracts, postharvest, disk-diffusion test

Introducción

Las cianobacterias son organismos procariotas autótrofos con la capacidad de producir metabolitos secundarios que pueden tener actividad antibacteriana, antivírica, antifúngica, antiparásita, antiinflamatoria e incluso antitumoral (Ramesh *et al.,* 2017). Entre estos se encuentran aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, pigmentos, vitaminas y esteroides.

La mayoría de las enfermedades de las plantas cultivadas, como el mildiú, oidios, necrosis, enfermedades vasculares, royas, carbones o micosis en post-recolección están producidas por hongos, ya sea hongos estrictamente parásitos o patógenos oportunistas, lo que da lugar a graves pérdidas económicas. Existe un creciente interés por parte de productores, industria agroalimentaria y consumidores en la búsqueda de nuevos productos biotecnológicos naturales más sanos y respetuosos con el medio ambiente para tratar las micosis en los cultivos o para los tratamientos postcosecha.

En este sentido, la investigación con cianobacterias es muy prometedora, pudiendo constituir una alternativa potencial como agentes de biocontrol. Sin embargo, los estudios en este campo son aún escasos. Algunos autores (Kim, 2006) sugieren que las cianobacterias no solo contribuyen a fertilizar los campos de cultivo sino que mantienen cierta actividad antimicótica. De hecho, Pawar *et al*., (2008), Kumar *et al*., (2013), Ghasemi *et al.,* (2003) encontraron actividad antifúngica en diferentes especies de cianobacterias pertenecientes, fundamentalmente a los géneros *Nostoc*, *Scytonema* o *Anabaena* (Shishido *et al*., 2015, Swain *et al*., 2017).

Este estudio tiene como objetivo principal detectar la posible actividad antifúngica de cianobacterias frente a hongos filamentosos que causan daños en cultivos y postrecolección. Como primera premisa es necesario poner a punto un procedimiento para evaluar dicha capacidad antifúngica mediante bioensayos *in vitro* adaptados a las características de estos hongos. Por tanto, los objetivos específicos son: 1) Seleccionar especies de cianobacterias y perfeccionar el método de obtención de extractos y 2) optimizar el método del test de difusión de disco para evaluar la actividad antimicrobiana, ajustando la densidad del inóculo fúngico y seleccionando el fungicida control.

Material y Métodos

Aislamiento y cultivo de las cianobacterias

Las cianobacterias empleadas se recolectaron de diferentes ambientes (Tabla 1) y se cultivaron en placas Petri con medios sólidos BG11 y BBM durante 45 días en una cámara de crecimiento con temperatura de 22±2 ºC, intensidad luminosa de 70 µE/m^2/s y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Tras este periodo de crecimiento, se aislaron las diferentes especies, se identificaron taxonómicamente y se cultivaron durante 30 días en los mismos medios de cultivo, en este caso líquidos, dotados de un sistema de aireación con el fin de optimizar el crecimiento y obtener suficiente biomasa para los ensayos antifúngicos.

Tabla 1. Número de extracto, cepa, identificación, hábitat y procedencia de las cianobacterias utilizadas.

Nº extracto	Cepa	Identificación	Hábitat	Procedencia
1	UMHCC10	*Scytonema crispum*	Dulceacuícola, sobre mortero, hierro y madera	Noria Grande de Abarán (Murcia)
2	UMHCC22	*Scytonema* cf. *varium*	Aerofítica, en piedra caliza	Molino de mano de Altorreal (Murcia)
3	UMHCC41	*Pseudocapsa dubia*	Aerofítica, en recipientes de barro	Bases de macetas en Altorreal (Murcia)
4	UMHCC43	*Phormidium* sp.	Dulceacuícola, en arroyo de alta montaña	Barranco de San Juan, Sierra Nevada (Granada)
5	UMHCC48	*Geitlerinema* sp.	Dulceacuícola, en embalses	Azud de Ojós (Murcia)
6	UMHCC50	*Leptolyngbya* sp.	Casmoendolítica, en costras yesíferas	Zarcilla de Ramos, Lorca (Murcia)
7	UMHCC55	*Plectonema* sp.	Edáfica, en suelos margosos	Pantano de Elche (Alicante)
8	UMHCC59	*Nostoc commune*	Edáfica, en suelos calizos	Campus de Elche (Alicante)

Obtención de extractos de cianobacterias

Se utilizó el método modificado de Madhumathi *et al.,* (2011). Brevemente: el ensayo se llevó a cabo a 20ºC en oscuridad. El material (0,5 g de biomasa de las especies de cianobacterias de la Tabla 1) se trituró en mortero y se mezcló con 10 mL del disolvente. Los disolventes utilizados fueron etanol 75% y acetona 75%. Se mantuvieron en agitación continua durante 1 día a 4ºC en oscuridad. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 3000 a rpm durante 30 minutos en centrífuga Heraeus Labofuge 400. Se realizó un barrido espectrofotométrico para cada extracto/solvente con espectofotómetro Helios alfa, con ʎ = 200-1100 nm para extractos cetónicos y ʎ = 200-800 nm para extractos etanólicos y acuosos con el ajuste necesario cuando fuera requerido. Con el fin de esterilizar los extractos para el ensayo posterior se filtraron cada uno de ellos con un filtro estéril tipo HEPA desechable de 0,45 micras y se conservaron a -20ºC hasta su uso.

Aislamiento y cultivo de los hongos

Tabla 2. Número de cepa, identificación y procedencia de los hongos utilizados.

Cepa	Identificación	Procedencia	Tipo trófico
UMH18007	*Alternaria* sp.	Frutos de *Citrus* x *limon* (limón)	Saprófito Patógeno oportunista
UMH18005	*Aspergillus niger*	Bulbos de *Allium cepa* (cebolla)	Saprófito Patógeno oportunista
UMH18008	*Botrytis cinerea*	Frutos de *Fragaria virginiana* (fresa)	Saprófito Patógeno oportunista
UMH18009	*Sclerotinia* sp.	Frutos *de Fragaria virginiana* (fresa)	Saprófito Patógeno oportunista
	Fusarium sp.	Colección de cultivos del CEBAS-CSIC, Murcia. (Dr. JA Pascual)	Parásito vascular
	Phytophthora citrophthora	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia	Parásito vascular
UMH18006	*Rhizopus stolonifer*	Pan	Saprófito

Los hongos utilizados se aislaron a partir de alimentos de origen vegetal con indicios visibles de daños físicos o colonización fúngica. Previa incubación en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas, en condiciones estériles, se tomaron con asa de siembra pequeñas porciones de hifas o esporas

visibles en el material, y se colocaron en placas Petri con medio de cultivo PDA. Las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 3-7 días. Posteriormente se seleccionaron porciones de las colonias iniciales sin signos de contaminación y se repicaron en nuevas placas. Se identificaron por sus características morfológicas macro y microscópicas (Moore *et al*., 2011). Además, se han utilizado dos hongos de colección (Tabla 2).

Test de difusión de disco para evaluación de la capacidad antifúngica

Para evaluar la capacidad antifúngica se utilizó la técnica de difusión en disco o método Kirby-Bauer (Bauer, 1996) adaptada para hongos filamentosos según el protocolo M51-A descrito por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010). Brevemente: Las placas con medio de cultivo PDA se inoculan con cada uno de los hongos, siguiendo el método de siembra en césped en tres direcciones y se dejan secar unos minutos. Los extractos de cianobacterias y los correspondientes controles se aplican sobre discos de papel Whatman, tipo AA, de 6 mm de diámetro a razón de 25 µl por disco. Los discos (4 por placa) se colocan de forma equidistante sobre el medio de cultivo. Todo el proceso se realiza en condiciones de esterilidad. Las placas se incuban en oscuridad, a 28 ^{0}C, y a las 72 h se miden las zonas o halos de inhibición. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El método se adecuó previamente para los parámetros densidad de inóculo fúngico y antifúngico control.

Para optimizar la densidad de inóculo fúngico se realizó un ensayo con todos los hongos a dos densidades. Se siguió el protocolo para hongos filamentosos M38 A, del CLSI (Cantón *et al*., 2007) modificado. A partir de cultivos de 7 días crecidos en PDA a 25^{0}C se prepararon inóculos de baja y alta densidad (2-3 o 4-5 toques del asa en el cultivo respectivamente, que se introducen en un tubo de cristal con 5 ml de agua estéril). Se agita vigorosamente durante 10-15 segundos en un agitador tipo vortex marca Heidolph Reax y se midió la Densidad Optica (DO) en un espectrofotómetro.

Para seleccionar el antifúngico control se realizó un test de difusión en disco con todos los hongos frente a Nystatina, Fluconazol, Oxicloruro de Cu y Fenhexamida. Los fungicidas Nistatina y Fluconazol se aplicaron como discos de 6,5 mm de diámetro de BioRad®, impregnados con 100 IU y 25 ug/g de producto respectivamente. Los fungicidas Oxicloruro de Cu 50% (Fertiberia®) y Fenhexamida 50 % (Taldor®, Bayer) se aplicaron cargando 25 µL de una solución del producto sobre discos de 6 mm de papel Whatman nº 1-Grado AA, previamente esterilizados. Dicha solución se preparó a la concentración indicada por el fabricante (1g/400 mL de agua para Oxicloruro de Cu y 1 g/750 mL de agua para Fenhexamida) y se esterilizó por filtración en un filtro CHM de 0,45 µm, de la marca CHMLA. En cada placa de Petri con medio PDA previamente inoculada con el correspondiente hongo se colocaron 5 discos (uno con cada fungicida y otro disco control con agua estéril).

Para determinar la capacidad antifúngica de los extractos de cianobacterias, se planteó un test de difusión de disco con el siguiente diseño experimental: Se evaluaron los extractos de 8 especies de cianobacterias (1-*Scytonema crispum,* 2-*Scytonema* cf. *varium,* 3-*Pseudocapsa dubia,* 4-*Phormidium* sp.*,* 5-*Geitlerinema* sp.*,* 6- *Leptolyngbya* sp.*,* 7-*Plectonema* sp., 8-*Nostoc commune*), con dos extractantes o disolventes en cada caso (E-etanol, A-acetona), además de una toxina algal, frente a 6 hongos (*Aspergillus, Alternaria, Botrytis, Sclerotinia, Fusarium y Rhizopus*); como control positivo se utilizó el fungicida Nistatina y como controles negativos acetona y etanol, lo que supone un total de 20 tratamientos para cada hongo, con tres repeticiones para cada uno.

Resultados y Discusión

Optimización de la obtención de los extractos

Los resultados del barrido espectrofotométrico se muestran en la tabla 3. Con el disolvente acetona se obtienen en general mayor número de picos de absorbancia, lo que podría significar un mayor número de metabolitos extraídos. Dado que no hay apenas información acerca de espectrometría para metabolitos con actividad biocida, son necesarios más análisis, como cromatografía, para confirmar

esta hipótesis. En cualquier caso, se consideró apropiado utilizar acetona y etanol como extractantes.

Tabla 3. Longitudes de onda de los picos obtenidos de los extractos (nm) con diferentes extractantes.

Extractos	Acetona	Etanol
1	212,339,385,660,804	215,323,433,665
2	210,272,338,401,674,802,1087	216,264,313,443,665
3	211,265,333,384,1005	218,320,417
4	211,294,351,417,643,1005,1087	218,414,665
5	212,264,287,349,410,674,804,1005	219,436,666
6	211,268,296,333,415,482,672,1005	219,478,665
7	210,291,424,670,1005,1093	219,474,664
8	205,294,341,388,667,802,1087	215,294,359,433,662

Optimización del inóculo fúngico para el test de difusión en disco

Uno de los principales problemas del test de difusión en disco con hongos filamentosos es la preparación de un inóculo lo suficientemente rico para obtener un cultivo en placa homogéneo, sin el característico crecimiento en colonias de los hongos, que permita apreciar con claridad los resultados de inhibición. En nuestro trabajo se han seguido las recomendaciones de la mayoría de los trabajos previos publicados (Soltani *et al*., 2005; Lopez-Oviedo *et al*., 2006; Cantón *et al*., 2007) referentes al documento M38-A del CLSI (NCCLS, 2002) con algunas modificaciones.

Para todos los hongos ensayados se obtuvo un crecimiento homogéneo a las dos densidades probadas (baja y alta) que permite la realización del test, excepto para *Botrytis cinerea* y *Phytophthora* (Tabla 4). Se ha comprobado que una turbidez de 0,5 unidades McFarland corresponde a un rango de 70-80% de transmitancia medida a 530 nm, y a una densidad del inóculo de 10^5-10^6 unidades formadoras de colonias por ml, suficiente para garantizar un crecimiento homogéneo en el medio de cultivo (Cantón *et al*., 2007; Martos *et al*., 2012). Según el protocolo M38-A se recomienda un inóculo de partida con una concentración del orden de 10^6 UFC/mL. Teniendo en cuenta que el tamaño y la densidad de las hifas y conidios o esporas son distintos para cada especie, la densidad óptica para obtener dicha concentración es también diferente. De trabajos previos (Cantón *et al*., 2007) se sabe que para *Aspergillus*, *Fusarium* y *Rhizopus* se obtiene un crecimiento homogéneo con una densidad óptica de entre 0,09 y 0,17 valores de absorbancia, aunque para otras especies como *Bipolaris* o *Penicillium* es de hasta 0,3 y para otras como *Phytophthora*, *Botrytis* o *Sclerotinia* no existen datos previos. En nuestro caso, una DO de entre 0,01 y 0,1 según las especies parece ser adecuada para el test.

Tabla 4. Densidad óptica (DO) y crecimiento homogéneo en placa *Petri*.

Especie	DO Inóculo baja densidad	Crecimiento homogéneo	DOInóculo alta densidad	Crecimiento homogéneo
Alternaria sp.	0,02	+	0,12	+
Aspergillus niger	0,07	+	0,13	+
Botrytis cinerea	0,04	-	0,15	+
Sclerotinia sp.	0,06	+	0,11	+
Fusarium sp.	0,01	+	0,19	+
Phytophthora citrophthora	0,01	-	0,10	+
Rhizopus stolonifer	0,05	+	0,13	+

Selección de antifúngicos comerciales control para el test de difusión de disco.

Se ensayaron diferentes productos conocidos por su actividad antifúngica. La Nistatina y el Fluconazol se usan habitualmente en antifungibiogramas como control (Ghasemi *et al*., 2003; Soltani *et al*., 2005; Kim, 2006). La Nistatina es un antifúngico del grupo de los poliénicos que actúa por alteración de la permeabilidad de la membrana de los hongos, fijándose a los esteroles, presentando capacidad fungicida y fungistática. El Fluconazol es un antifúngico del grupo de los azoles que inhibe el citocromo P450 de la enzima 14 alfa demetilasa, la cual interviene en la formación de ergosterol, que es un componente de la membrana plasmática de los hongos. Es principalmente fungistático, aunque también puede actuar como fungicida. El oxicloruro de Cu y la Fenhexamida son fungicidas usados en agricultura, específicamente para el tratamiento de enfermedades producidas por hongos, tales como antracnosis, alternaría, moteado, cribado o mildiu por lo que se consideró interesante testar su actividad antifúngica *in vitro*. El ion Cu reacciona con las enzimas celulares del hongo, provocando la desnaturalización de las proteínas, especialmente en las fases iniciales de colonización. La Fenhexamida es un compuesto del grupo de las hidroxianilinas. Actúa inhibiendo el crecimiento del tubo germinativo de los hongos en la superficie de las plantas y en los primeros estadíos de la colonización de la planta por parte del hongo.

En el test de difusión de disco realizado, el fungicida Nistatina mostró un efecto inhibitorio del crecimiento en todos los hongos, excepto en *Phytophthora*. El fungicida Fluconazol solo mostró una leve acción inhibitoria en *Alternaria*. Contrariamente a lo esperado, a excepción de Oxicloruro de Cu, que únicamente inhibió el crecimiento de *Sclerotinia* los fungicidas usados en agricultura no ejercieron efecto inhibitorio sobre los hongos en el ensayo *in vitro* realizado (Figura 1, Tabla 5). Esto pudo deberse a que la esterilización por filtración retuviera las moléculas responsables de la acción fungicida, o bien a que sea necesario utilizar una dosis más alta que la recomendada por el fabricante, para los ensayos realizados *in vitro*. Por ello, se seleccionó Nistatina para posteriores ensayos.

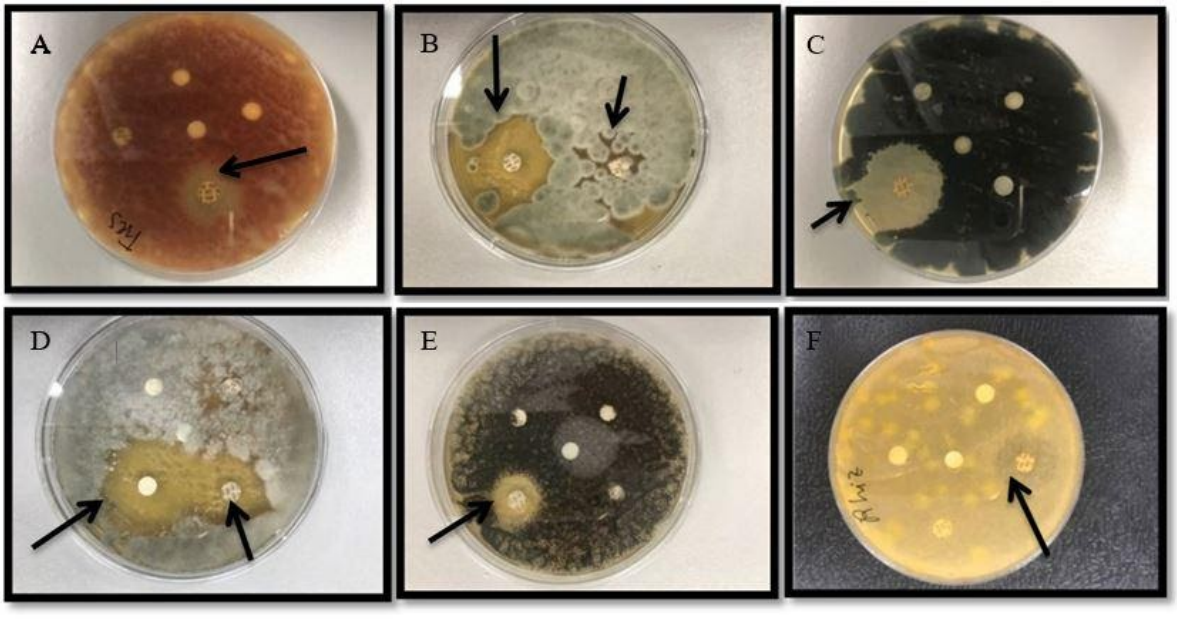


Figura 1. Efecto de antifúngicos comerciales (Nistatina, Fluconazol, Oxicloruro de Cu y Fenhexamida) sobre el crecimiento de distintos hongos filamentosos en medio PDA. A: *Fusarium*, B: *Alternaría*, C: *Botrytis,* D: *Sclerotinia*, E: A*spergillus*, F: *Rhizopus.* Las flechas señalan el halo de inhibición provocado por Nistatina en todos los casos, Fluconazol en *Alternaria* y oxicloruro de Cu en *Sclerotinia*.

Tabla 5. Inhibición producida por antifúngicos comerciales sobre el crecimiento de distintos hongos filamentosos en medio PDA (+: hay inhibición; -no hay inhibición)

Hongo	Nystatina	Fluconazol	Oxicloruro Cu	Fenhexamida
Aspergillus	+	-	-	-
Alternaria	+	+	-	-
Botrytis	+	-	-	-
Sclerotinia	+	-	+	-
Fusarium	+	-	-	-
Phytophthora	-	-	-	-
Rhizopus	+	-	-	-

Capacidad antifúngica de extractos de cianobacterias.

Según los resultados obtenidos en ensayos anteriores, los inóculos para *Alternaria*, *Aspergillus*, *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Rhizopus*, se prepararon de baja densidad, mientras que para *Botrytis* se necesitó preparar inóculo de alta densidad. *Phytophthora* se descartó por no presentar sensibilidad a la Nistatina, el antifúngico control seleccionado. Se evaluaron los extractos de cianobacterias con los dos extractantes utilizados (acetona y etanol).

Tabla 6. Halos de inhibición (cm) tras 72h desde el inicio del cultivo. E (etanol), A (acetona), TOX (Toxina). Extracto de cianobacteria (1-*Scytonema crispum,* 2-*Scytonema* cf. *varium,* 3-*Pseudocapsa dubia,* 4-*Phormidium* sp.*,* 5-*Geitlerinema* sp.*,* 6- *Leptolyngbya* sp.*,* 7-*Plectonema* sp., 8-*Nostoc commune*). (-) indica resistencia; (±) indica leve inhibición. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Tratamiento	*Alternaria* sp.	*Aspergillus niger*	*Botrytis cinerea*	*Sclerotinia* sp.	*Fusarium* sp.	*Rhizopus stolonifer*
E1	-	-	-	±	-	-
E2	-	-	-	±	-	-
E3	-	-	-	±	-	-
E4	-	-	-	±	-	-
E5	-	-	-	±	-	-
E6	-	-	-	±	-	-
E7	-	-	-	±	-	-
E8	-	-	-	±	-	-
A1	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	-
A6	-	-	-	-	-	-
A7	-	-	-	-	-	-
A8	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-
Acetona	-	-	-	-	-	-
Nistatina	3,20	1,80	3,00	3,46	1,63	0,96
TOX	-	-	-	-	-	-

En las especies *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea, Rhizopus stolonifer* y *Fusarium* sp. solo se apreciaron halos de inhibición en los discos de Nistatina. *Sclerotinia* sp. mostró halos de inhibición en los discos con Nistatina, pero también se pudo observar una menor densidad de hifas alrededor de los discos con los extractos algales en etanol, aunque sin llegar a formar zonas de inhibición patentes. (Tabla 6). La ausencia de efecto inhibitorio de los extractos en las condiciones ensayadas podría deberse a la carencia de actividad antifúngica en las especies seleccionadas, pero también a algunos

aspectos metodológicos. Por ejemplo, que la concentración del extracto fuera demasiado baja para provocar efecto en los hongos, que la cantidad usada en el disco fuera muy baja o la naturaleza y eficacia del solvente para extraer los compuestos activos. Por otro lado, se sabe que los hongos tipo moho, utilizados en este trabajo tienen un crecimiento muy vigoroso en muy corto espacio de tiempo, por lo que quizá sería conveniente inocular las placas de cultivo tras un tiempo de colocar los extractos, con el fin de permitir su difusión al medio. Otros autores (Kim, 2006; Swain *et al*., 2017) han detectado capacidad antifúngica con alguna de las especies usadas aquí como *Nostoc* pero con extractos en metanol y éter petróleo y una dosis mucho mayor (100 µL). Sin embargo, dado que el objetivo final de esta investigación es la aplicación en productos alimentarios, nosotros hemos preferido usar extractantes menos nocivos.

Conclusiones

El método de extracción llevado a cabo permite extraer ciertos compuestos todavía no identificados y se puede llevar a cabo fácilmente en laboratorio. Los extractantes acetona y etanol se consideran adecuados.

El método de difusión de disco en agar es adecuado para evaluar la capacidad antifúngica sobre hongos filamentosos, ajustando el inóculo fúngico a una densidad óptica de 0,01-0,1 según las especies, y utilizando el fungicida nistatina como control.

Los extractos etanólicos parecen ser más efectivos en la inhibición del crecimiento de *Sclerotinia* sp., afectando a la densidad del micelio.

Se plantean mejoras del método para el futuro, como valorar un método de trituración de las cianobacterias más efectivo, utilizar mezclas de solventes o solventes apolares en combinación, ensayar otras especies cianobacterianas y/o fúngicas, o realizar pruebas de inhibición por concentración mínima del extracto diferente de la utilizada.

Bibliografía

Bauer, A.W., 1966. Am. J. Clin. Pathol. 45(4), 493-496.

Cantón, E., Martín, E., Espinel-Ingroff, A., 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Rev. Iber. Mic., 15.

CLSI, 2010. Method for Antifungal Disk Diffusion susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standars Institute.

Ghasemi, Y., Tabatabaei, M., Shokravi, S., Soltani, N., Zarrini, G., 2003. Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from North of Iran. J. Sci. Islam. Repub. Iran 14 (3), 203-209.

Kim, J.D., 2006. Screening of Cyanobacteria (Blue-Green algae) from Rice Paddy Soil for Antifungal Activity against Plant Pathogenic Fungi. Mycobiology 34(3), 138–142. https://doi.org/10.4489/myco.2006.34.3.138

Kumar, M., Kumar Tripathi, M., Srivastava, A., Kumar Gour, J., Kumar Singh, R., Tilak, R., 2013. Cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii* and *Aphanothece bullosa* as antifungal and antileishmanial drug resources. Asian Pac J Trop Biomed. 3(6), 458–463. https://doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60096-9

López-Oviedo, E., Aller, A.I., Martín, C., Castro, C., Ramirez, M., Pemán, J.M., Cantón, E., Almeida, C., Martín-Mazuelos, E., 2006. Evaluation of Disk Diffusion Method for Determining Posaconazole Susceptibility of Filamentous Fungi: Comparison with CLSI Broth Microdilution Method. E. Antimicrob. Agents Chemother. 50(3), 1108-1111. https://doi.org/10.1128/aac.50.3.1108-1111.2006

Madhumathi, V., Deepa, P., Jeyachandran, S., 2011. Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake. Int. J. Microbiol. Res. 2 (3), 213-216.

Martos, A.I., Martín-Mazuelos, E., Serrano, C., González, T., Almeida, C., Puche, B., Cantón, E., Pemán, J.,

Espinel-Ingrof, A., 2012. Evaluation of disk difusión method compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of 3 echinocandins against *Aspergillus* spp. Diagn. Microbiol. Infect. Disc. 73(1), 53-6.

Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., 2011. 21st Century Guidebook to Fungi (1ª edición). Cambridge University Press.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa., 22 No. 16.

Pawar, S.T., Puranik, P.R 2008. Screening of terrestrial and freshwater halotolerant cyanobacteria for antifungal activities. World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 1019. https://doi.org/10.1007/s11274-007-9565-6.

Ramesh Babu, M., Malathi, T., Digamber Rao, B., 2017. Antifungal Activity of Selected Cyanobacteria against Fungal Pathogens. Int. J. Phar. Biol. Sci. 7, 207-213.

Shishido, T.K., Humisto, A., Jokela, J., Liu, L., Wahlsten, M., Tamrakar, A., 2015. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. Mar. Drugs 13(4), 2124–2140. https://doi.org/10.3390/md13042124

Sinang, S.C., Poh, K.B., Shamsudin, S., Sinden, A., 2015. Preliminary Assessment of Cyanobacteria Diversity and Toxic Potential in Ten Freshwater Lakes in Selangor, Malaysia. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 95(4), 542-7. https://doi.org/10.1007/s00128-015-1620-7

Soltani, N., Khavari-Nejad, R.A., Tabatabaei Yazdi, M., Shokravi, S., Fernández-Valiente E., 2005. Screening of Soil Cyanobacteria for Antifungal and Antibacterial Activity. Pharm. Biol. 43, 455-459. https://doi.org/10.1080/13880200590963871

Swain, S., Paidesetty, S.K., Padhy, R.N. 2017. Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. Biom. Pharmacother. 90, 760-776. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.030

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Mejora de la sostenibilidad de la fertilización en fresa: mecanismos fisiológicos desencadenados por la inoculación con bacterias PGP bajo condiciones subóptimas de aplicación de nitrógeno

E. Romano [1], J.V. García López [1], N.J. Flores-Duarte [2], S. Merino [2], J. Mesa-Marín [2], I.D. Rodríguez-Llorente [2], S. Redondo-Gómez [1], E. Pajuelo [2] y E. Mateos-Naranjo [1]

[1] Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 1095, 41012, Sevilla, e-mail: eromano@us.es
[2] Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla

Resumen

El carácter intensivo de cultivos como la fresa se relacionan con la necesidad de emplear una gran cantidad de insumos que, si bien mantienen un elevado nivel de producción, suponen un enorme coste económico y riesgo medioambiental por la lixiviación de sus compuestos. Por ello, en este estudio se investigó la influencia de bacterias de las halófitas, altamente resistentes al estrés ambiental, y con propiedades PGP (incluida la fijación de N) sobre la tolerancia de la fresa frente al déficit de nitrógeno, haciéndose hincapié en los mecanismos fisiológicos de tolerancia activados por la inoculación bacteriana. Se diseñó un experimento en condiciones controladas de invernadero, en el que se comparó el crecimiento, las características del intercambio de gases , la eficiencia energética del aparato fotoquímico (PSII) y las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en plantas de fresas sometidas a los siguientes tratamientos: **i)** fertilización química nitrogenada del 100%, tratamiento control; **ii)** fertilización química, 0% N, tratamiento B-; **iii)** Fertilización química, 0% N más co-inoculación con un consorcio bacteriano, tratamiento B+, durante 40 días, en un diseño de tres bloques al azar (n=21). Nuestros resultados mostraron una caída drástica en el crecimiento de la planta (biomasa aérea y subterránea) superior al 70% en plantas crecidas en ausencia de nitrógeno (N-) en comparación a las plantas control. El efecto estuvo acompañado de una reducción del contenido hídrico relativo (CHR) de la hoja de un 15%. Sin embargo, se observó que estos efectos se vieron amortiguados con la inoculación bacteriana, de forma que en presencia de microorganismos el crecimiento se mantuvo hasta en un 50% y la reducción en el CHR fue inferior a un 7% respecto al tratamiento control. Los efectos positivos de la inoculación de la planta en su tolerancia frente al déficit en nitrógeno vinieron precedidos de una mejora general de la funcionalidad y estructura de su aparato fotoquímico. Así, la tasa de fotosíntesis neta (A_N) se redujo un 18% en plantas inoculadas (B+), siendo esta caída de hasta un 53% en plantas sin inocular y crecidas en ausencia de N (N-) respecto al tratamiento control. Esta mejora en el metabolismo de asimilación del carbono se debió a unas menores limitaciones difusionales, como indicaron los mayores valores de conductancia estomática (g_s) Finalmente, se observaron beneficios a nivel de eficiencia energética de los fotosistemas, el transporte de electrones y las concentraciones de clorofilas y carotenoides. Nuestros resultados sugieren un papel beneficioso del empleo de bacterias con diversas propiedades PGP, en la mejora de tolerancia del cultivo de la fresa frente a la aplicación limitada de insumos químicos. No obstante, sigue siendo necesario el desarrollo de estudios en condiciones de campo para determinar el potencial real de esta herramienta.

Palabras clave: ecofisiología, fertilización química, fresa, nitrógeno, PGP.

Improving the sustainability of strawberry fertilization: physiological mechanisms triggered by inoculation with PGP bacteria under suboptimal nitrogen application conditions

Abstract

The intensive nature of crops such as strawberries are related to the need to use a large amount of inputs that, although they maintain a high yield level, entail a huge economic cost and environmental risk due to the leaching of their compounds. Therefore, this study investigated the influence of halophyte bacteria, highly resistant to environmental stress and with PGP properties (including N fixation) on strawberry tolerance to nitrogen deficiency, emphasizing the physiological tolerance mechanisms triggered by bacterial inoculation. An experiment was designed under controlled greenhouse conditions, in which we compared growth, gas exchange characteristics , the energy efficiency of the photochemical apparatus (PSII) and the concentrations of photosynthetic pigments in strawberry plants subjected to different treatments: i) 100% nitrogen chemical fertilization, control; ii) chemical fertilization, 0% N, B- ; iii) Chemical fertilization, 0% N plus co-inoculation with a bacterial consortium, treatment B +, for 40 days, in a randomized three-block design (n=21). Our results showed a drastic drop in plant growth (aboveground and underground biomass) of over 70% in plants grown in the absence of nitrogen (N-) compared to control plants. The effect was accompanied by a reduction in the water content (CHR) of the leaf of 15%. However, it was observed that these effects were dampened with bacterial inoculation, so that in the presence of microorganisms, growth was maintained up to 50% and the reduction in CHR was less than 7% compared to the control treatment. The positive effects of plant inoculation on its tolerance to nitrogen deficiency were preceded by a general improvement in the functionality and structure of its photochemical apparatus. Thus, the net photosynthesis rate (A_N) was reduced by 18% in inoculated plants (B+), this drop being up to 53% in plants without inoculation and grown in the absence of N (B-) compared to the control treatment. This improvement in carbon assimilation metabolism was due to lower diffusion limitations, as indicated by the higher values of stomatal conductance (g_s). Finally, benefits were observed in terms of energy efficiency of photosystems, electron transport and concentrations of chlorophylls and carotenoids. Our results suggest a beneficial role of the use of bacteria with various PGP properties, in improving the tolerance of the strawberry crop against the limited application of chemical inputs. However, it is still necessary to carry out studies under field conditions to determine the real potential of this tool.

Keywords: ecophysiology, chemical fertilization, strawberry, nitrogen, PGP.

Introducción y/o Justificación

El sector de la fresa constituye un motor económico y social fundamental para Andalucía, ya que genera unos 45.000 puestos de trabajos directos y un beneficio de exportación por campaña de cerca de 500 millones de euros (DATACOMEX, 2019). Se trata de un cultivo de carácter intensivo que requiere de una gran cantidad de recursos para su explotación, entre los que destacan grandes cantidades de agua de calidad y de fertilizantes, (Martínez-Ferri et al., 2016). Estas características lo relacionan con diversas consecuencias medioambientales como la contaminación de aguas superficiales y subterráneas a causa de la lixiviación en exceso de sus residuos (Lozano et al., 2016).

De ahí, surge el reto de investigar nuevas estrategias de manejo que hagan de la fresa un cultivo más sostenible. En este contexto, una herramienta prometedora es el aprovechamiento de la microbiota que se desarrolla naturalmente en los suelos. Esta microbiota mejora las condiciones del suelo (Ruzzi y Aroca, 2015) a la vez que causa efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas y su resistencia al estrés ambiental (Chookietwattana y Maneewan, 2012). Dentro de ella destaca las bacterias que habitan en la rizosfera o en la superficie de las raíces vegetales y que promueven el crecimiento de las plantas (Ruzzi y Aroca, 2015). Se distinguen distintos mecanismos de acción, entre los que se incluyen la liberación de hormonas, como la auxina, que provoca un efecto promotor del crecimiento del sistema radical (Patten y Glick, 2002). La producción de ACC desaminasa, una enzima que hidroliza el precursor del etileno y, por tanto, disminuye la concentración de etileno producido por la planta en situación de estrés, (Glick, 2012). También se distinguen mecanismos directos como la facilitación en la adquisición de nutrientes, la fijación de nitrógeno atmosférico (Olivares, 2008), la solubilización de

fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999), etc. Además, se han descrito mecanismos indirectos como la formación de biofilms que facilitan la competencia frente a agentes patógenos, la absorción de nutrientes y la adaptación al cambio de las condiciones ambientales (Seneviratne et al., 2010). Por todo ello, las bacterias han sido ampliamente utilizadas para la mejora de diversos cultivos (Zaidi et al., 2015) e incluso bajo condiciones de estrés ambiental (Paul y Lade, 2014). No obstante, el número de cepas bacterianas con propiedades PGP que se comercializan para prácticas agrícolas a nivel mundial es muy escaso, no excediendo las 25 cepas, pertenecientes a 11 géneros, por lo que surge la necesidad de aumentar la selección de cepas PGP con actividades biológicas apropiadas a contextos agronómicos concretos (Glick, 2012).

Así, el objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de bacterias aisladas de las halófitas, altamente resistentes al estrés ambiental y con propiedades PGP (incluida la fijación de N) sobre la tolerancia de la fresa frente al déficit de nitrógeno, haciéndose énfasis en el estudio de los mecanismos fisiológicos de tolerancia activados por la inoculación bacteriana.

Material y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

El estudio fue llevado a cabo entre enero y marzo de 2021 en el servicio general de invernadero (SGI) de la Universidad de Sevilla, utilizando plantas de fresa de la variedad Rociera proporcionadas por la empresa Agro GM SL. Previamente al inicio del estudio, las plantas fueron sembradas individualmente en macetas de 0,5 L rellenas con vermiculita y se sometieron a un pretratamiento de limitación de fertilización química durante los 3,5 meses anteriores al estudio (riego semanal con agua del grifo). Las plantas se mantuvieron a una temperatura controlada de entre 21/25ºC, 40-50% HR y una densidad máxima de flujo de fotones incidente a nivel de las hojas de 1000 µmol m^{-2} s^{-1}. Posteriormente, en un diseño de tres bloques al azar (n=21) se prepararon los siguientes tratamientos: i) fertilización química nitrogenada del 100%, tratamiento control; ii) fertilización química, 0% N, tratamiento B-; iii) Fertilización química, 0% N más co-inoculación de un consorcio bacteriano constituido por bacterias PGP, tratamiento B+.

Características y preparación del inóculo bacteriano

El inóculo bacteriano utilizado estuvo integrado por cinco cepas diferentes que fueron aisladas de la rizosfera de las halófitas *Spartina densiflora, Spartina marítima, Salicornia ramosissima y Halimione portulacoides*. Estas bacterias se caracterizan por una alta resistencia a la salinidad y propiedades PGP, las cuales se indican en la Tabla 1. Para la preparación del inóculo, se siguió los detalles técnicos indicados en Mesa et al. (2015).

Tabla 1. Cepas y características integrantes del inóculo empleado en el desarrollo del experimento de limitación de fertilización química.

Cepa	Rizobacteria /endofito	Fijación de nitrógeno	Solubilización de fosfato (halo mm)	Producción de sideróforos (halo mm)	Producción de IAA (mg/ml)	Producción de biofilm	Producción de ACC desaminasa
V. paradoxus	E	+	-	40	2,11	+	+
SDT3	R	-	+	32	-	ND	-
SMT38	R	+	-	10	-	++	-
SRT15	R	+	9	-	20,99	-	-
HPJ40	R	+	11	15	-	++	-

Análisis del crecimiento

La variación de la tasa de crecimiento se calculó en función de la diferencia de peso seco y peso fresco de raíz, tallo y hojas, así como de flores y frutos. Tras el crecimiento durante los meses de ensayo, las plantas fueron recolectadas y pesadas, obteniendo muestras de biomasa aérea y subterránea para la medición de los parámetros: peso fresco (PF), peso turgente (PT), y peso seco (PS), medido tras depositar las muestras de hojas en el horno a 70ºC durante 48 horas. Posteriormente se calculó el contenido hídrico relativo (CHR), siguiendo la fórmula: [(PF-PS) /(PT-PS)]*100.

Medidas instantáneas de intercambio de gases

Al final del estudio, se realizaron medidas de intercambio de gases en hojas completamente desarrolladas escogidas al azar de cada una de las plantas de los tres tratamientos. Para ello se utilizó un analizador de gases por infrarrojo en sistema abierto, equipado con una cámara de medidas de fluorescencia (LI-6800-01, LI-COR Inc., Neb., USA). La tasa de fotosíntesis neta (A_N), la conductancia estomática de CO_2 y la concentración de CO_2 intercelular (Ci) se determinaron a 400 ppm de CO_2, 28±1ºC de temperatura, 50 ± 1 % de humedad relativa y 1000 µmol m^{-2} s^{-1} de intensidad de radiación luminosa. Además, midió la respiración (Rd) bajo las mismas condiciones, pero aclimatando la planta a oscuridad durante 30 min. Por otro lado, en la misma superficie de estas hojas, se registraron la eficiencia real del fotosistema II ($\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$) y la tasa de transporte de electrones (ETR= Φ_{PSII} x PAR x 0.84 x 0.5).

Medidas de fluorescencia de la clorofila a

Para las medidas de fluorescencia de la clorofila se utilizó un fluorímetro portátil, modulable (FMS-2, Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido) en las mismas hojas en las que se realizaron las medidas de intercambio de gases (n = 12, dos por planta).

El nivel mínimo de fluorescencia en condiciones de adaptación a la oscuridad (F_0) se midió utilizando un pulso modulado <0,05 µmol m^{-2} s^{-1} de 1,8 µs. La fluorescencia máxima en este estado (F_m) se midió tras aplicar un pulso saturante de luz actínica de 15000 µmol m^{-2} s^{-1} durante 0,7 segundos. A partir de estos valores se calculó la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) y eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II (F_v/F_m).

Finalmente, se realizaron medidas de fluorescencia retarda en hojas completamente desarrolladas en plantas de los diferentes tratamientos (n = 5), utilizando el sistema de imágenes para plantas y software LB 985 NightSHADE (Berthold Technologies Bioanalytic, Alemania). Durante el conteo de fotones, se suministró luz desde dos emisores de luz (LED) rojos (660 nm) y azules (470 nm) a 70 µmol m^{-2} s^{-1} de forma continua durante 60 segundos. La cámara de imágenes NightSHADE se mantuvo a una temperatura constante de 22ºC. Utilizando las imágenes digitalizadas se calculó la relación total de complejos clorofila-proteína/área (cps/Área).

Medidas de concentración de clorofilas

Las medidas de pigmentos se realizaron al final del experimento en hojas completamente desarrolladas elegidas al azar (n = 6). Se realizó una extracción con acetona al 100% y el sobrenadante resultante se escaneó en un espectrofotómetro de doble haz (Hitachi Ltd., Japan) desde una longitud de onda de 350 a 750 nm con medidas cada 1 nm. Finalmente, el espectro de absorbancia obtenido se utilizó para la cuantificación de los pigmentos introduciéndolo en una biblioteca de ajustes de Gauss-Peak Spectra (GPS), utilizando SigmaPlot Software (Küpper et al., 2007). Finalmente, el índice del estado de

depoxidación (DES) como: ([Violaxantina] + [Anteroxantina]) / ([Violaxantina] + [Anteroxantina] + [Zeaxantina]).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos ser realizaron utilizando el paquete informático Statistica v. 10.0 (Statsoft Inc.). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (F-test). Inicialmente se comprobó la normalidad y homogeneidad de los datos con el test de Kolmogorov-Smirnov y de Brown-Forsythe, respectivamente. Los test de anova que resultaron significativos fueron precedidas de un test post hoc de Tukey para la identificación de los contrastes de los parámetros entre los tres tratamientos experimentales.

Resultados y Discusión

Efecto del inóculo el crecimiento vegetal

Nuestros resultados mostraron una caída drástica en el crecimiento (de las plantas con tratamiento de ausencia de nitrógeno (B-) superior al 70% respecto las plantas control (Anova, $p < 0.01$; Figura 1A, B). Este efecto estuvo acompañado de una reducción del contenido hídrico relativo (CHR) de la hoja del 15% (Anova, $p < 0.01$; Figura 1C). Sin embargo, se observó que estos efectos se vieron amortiguados con la inoculación bacteriana, manteniendo el crecimiento de las plantas B+ hasta en un 50%, con una reducción del CHR inferior al 7% respecto al tratamiento control (Anova, $p < 0.05$; Figura 1A-C). Este efecto beneficioso de las PGPR sobre el crecimiento ya ha sido descrito en estudios previos en frutos rojos, como De Silva et al. (2000), que reportaron un aumento del área foliar y tallos en frambuesa. Así mismo, se evidenció un efecto positivo de la inoculación sobre el CHR a nivel de la hoja, lo que podría relacionarse con la también observada reducción de la ratio biomasa aérea/subterránea de plantas inoculadas (B+). Esta mayor inversión en biomasa subterránea les podría haber permitido la exploración de mayores volúmenes de suelo para la adquisición de recursos (Padilla et al., 2007). No obstante, sería necesario profundizar en esta idea realizando estudios de campo donde no se tenga un efecto de limitación de crecimiento impuesto por maceta que podría estar enmascarando parcialmente esta tendencia.

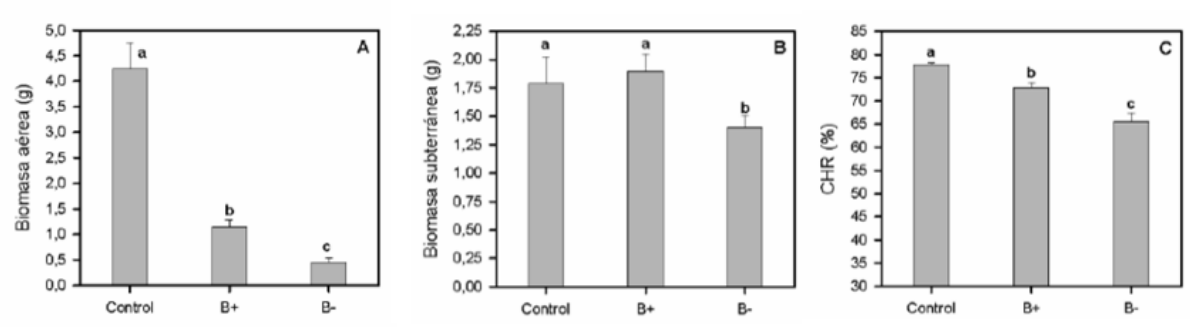


Figura 1. Biomasa aérea (A), biomasa subterránea (B) y contenido hídrico relativo, CHR (C) en plantas de fresa después de 40 días de tratamiento con fertilización química con medio BNM, (control), biofertilización mediante la inoculación con inóculo constituido por bacterias PGP y sin nitrógeno (B+) y fertilización química con medio BNM 0% N (B-). Diferentes letras indican medias significativamente diferentes (Tukey test).

Parámetros fisiológicos de las hojas

Respecto al intercambio de gases, se observó que la tasa de fotosíntesis neta (A_N) en ausencia de nitrógeno se redujo solamente en un 18% en plantas inoculadas (B+), siendo esta caída de hasta un 53% en plantas no inoculadas (B-) respecto al tratamiento control (Anova, $P < 0.01$; Figura 2A). Igual

sucede en los valores de conductancia estomática (g_s) (Figura 2B), que se acompañan de una menor concentración de CO_2 intercelular (C_i), y un aumento registrado de respiración oscura en plantas B- (Anova, $P < 0.05$; Figura 2C, D). Así, mientras la falta de nitrógeno afectó negativamente a la asimilación del carbono en B-, la inoculación bacteriana suavizó este efecto mejorando el metabolismo de asimilación del carbono gracias a menores limitaciones en la conductancia estomática (g_s).

En cuanto a la fluorescencia de la clorofila a, en plantas inoculadas se observaron valores de eficiencia fotoquímica (F_v/F_m) dentro del que se considera un rango óptimo para muchas especies vegetales (0.79 a 0.84). Valores más bajos indican un estrés en la planta (Maxwell y Johnson, 2000), como aquellos presentes en el tratamiento B- (Anova, $P < 0.05$; Figura 3C), junto con menores valores de fluorescencia (F_0, F_m) (Figuras 3A, B), eficiencia real del fotosistema II (Φ_{PSII}) (Figura 3D) y tasa de transporte de electrones (ETR), con una caída aproximada del 50% respecto al control (Anova, $P < 0.01$; Figura 4A). Como consecuencia, en plantas B- sucedió un incremento sustancial de la relación ETR/A_N, mientras que aquellas inoculadas presentaron una ratio ETR/A_N similar al tratamiento control (Figura 4B). La relación ETR/A_N ha sido descrita como una buena aproximación del riesgo potencial de estrés oxidativo derivado de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En nuestro estudio, el efecto de las PGPR en el mantenimiento de esta ratio a valores similares al control podría haber contribuido a reducir el riesgo de estrés oxidativo respecto las plantas no inoculadas, lo cual reafirma su efecto beneficioso (Perez-Romero et al. 2018).

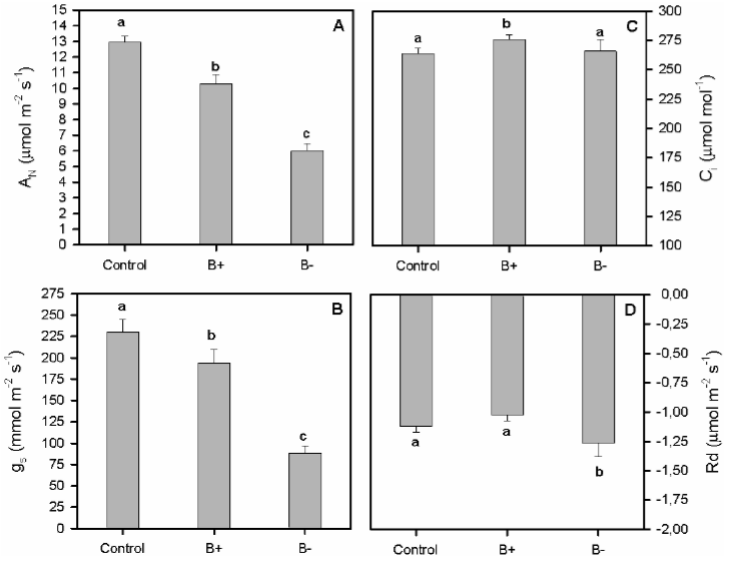


Figura 2. Representación de las medias de los parámetros: tasa de fotosíntesis neta, AN (A), conductancia estomática, gs (B), concentración de CO2 intercelular, Ci (C) y tasa de respiración oscura, Rd (D) para los distintos tratamientos. Diferentes letras indican medias significativamente diferentes (Tukey test).

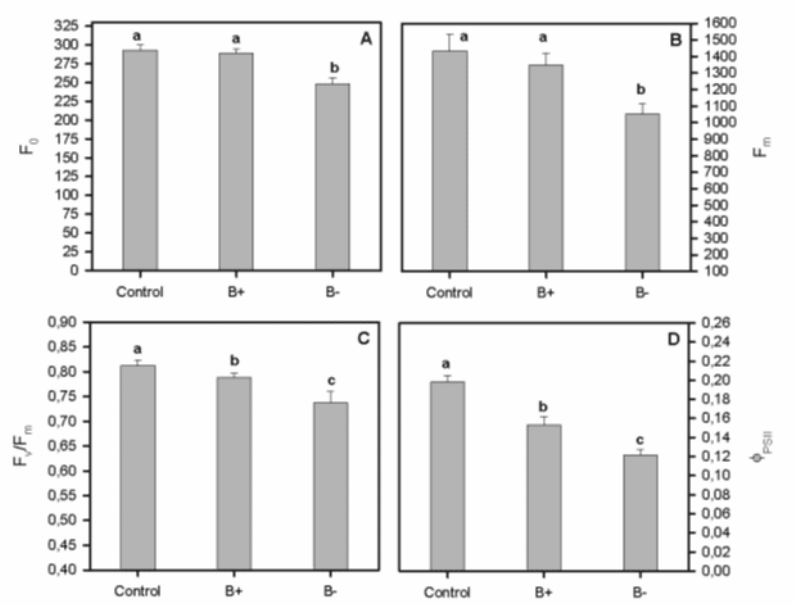


Figura 3. Fluorescencia mínima, F_0 (A), fluorescencia máxima, F_m (B), eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II F_v/F_m (C) y rendimiento cuántico del fotosistema II, Φ_{PSII} (D). Las distintas letras indican diferencias significativas entre medias (Tukey test).

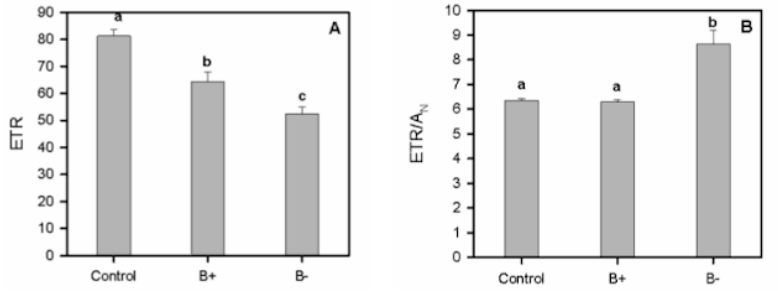


Figura 4. Tasa de transporte de electrones, ETR. Las diferentes letras indican medias significativamente diferentes de otras (Tukey test).

Los resultados de la eficiencia fotoquímica del PSII sugieren que el desempeño del PSII fue afectado positivamente por la presencia del inóculo, puesto que este parámetro caracteriza el rendimiento cuántico máximo de las reacciones fotoquímicas (Maxwell y Johnson, 2000). Estudios previos ya demostraron una relación directa entre la eficiencia del PSII y el rendimiento del transporte de electrones (Genty et al., 1989), confirmando nuestros resultados.

Igualmente, se ha observado un efecto de las bacterias PGP sobre el grado de actividad fotosintética, pues los valores más bajos de fluorescencia retardada, con coloración azul, corresponden a las plantas sometidas a fertilización química con ausencia de nitrógeno (B-), las cuales además presentaron una menor concentración de complejos clorofila-proteína, cps (Anova, $p < 0.05$; Figura 5B), mientras que estos efectos se vieron amortiguados con la inoculación bacteriana (B+) presentando una alta intensidad de colores rojos/naranja (Figura 5A). La imagen muestra un claro aumento en la concentración de pigmentos fotosintéticos en las hojas en presencia del inóculo, lo cual coincide con los resultados del análisis del contenido en clorofilas y carotenoides: menor de un 50% en plantas no inoculadas (B-) respecto al control, mientras que en B+, mostró valores similares al control, tal como se muestra en la Tabla 2.

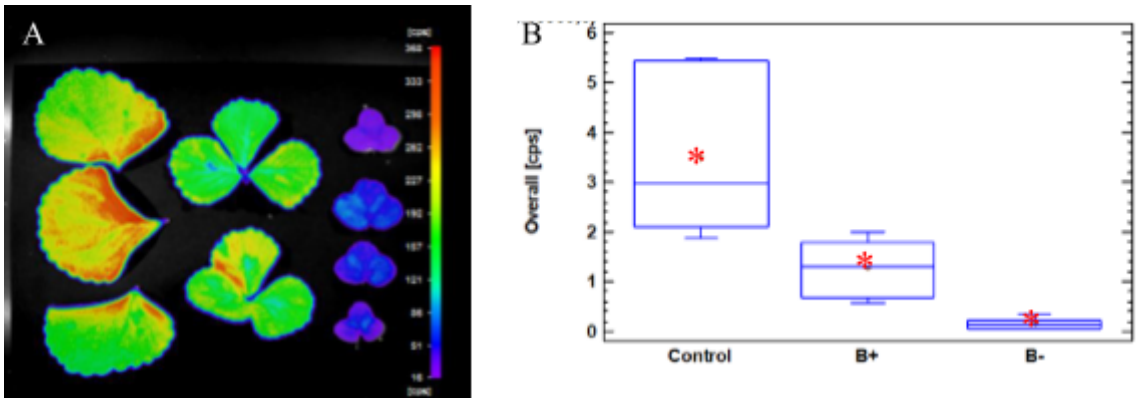


Figura 5. Imagen de fluorescencia retardada (A), concentración de complejos clorofila-proteína, cps (B). Los asteriscos en el panel B indican diferencias significativas entre grupos (Tukey test).

Estos resultados refuerzan la hipótesis del papel positivo de la inoculación bacteriana en la eficiencia fotosintética, y se relacionan con los obtenidos previamente en otros estudios en fresa como (Thakur et al., 2018). La producción de auxinas, fijación de N y solubilización de fósforo que caracterizan a nuestras bacterias seleccionadas, aumentan la absorción de nutrientes, los cuales sostienen la síntesis de los pigmentos fotosintéticos necesarios para el funcionamiento del aparato fotoquímico (Olanrewaju et al., 2017). Esto confirma el incremento en contenido de pigmentos fotosintéticos observado en nuestros resultados. Además, los complejos proteicos pigmentarios de la fotosíntesis ejercen un papel fundamental en la absorción de la energía luminosa y en las principales etapas de su conversión a otras formas de energía (Green y Durnford, 1996), coincidiendo esta respuesta con el aumento significativo en la asimilación de carbono y en la relación total de complejos clorofila-proteína/área registrada en el tratamiento B+.

Tabla 2. Contenido de clorofila (a+b) y carotenoides totales (µg / g de peso fresco), relación de carotenoides/clorofilas totales, de Chl a/b e índice del estado de depoxidación (DES).

Tratamiento		Total Chl (a+b)	Total Carotenoides	Carotenoides/Chl	Chl a/b	DES
Control	Media	537,86	120,73	0,23	2,80	0,58
	ESM	13,26	2,61	0,01	0,04	0,06
B+	Media	574,60	128,93	0,23	2,59	0,57
	ESM	25,55	3,84	0,01	0,02	0,08
B-	Media	280,52	72,03	0,26	2,47	0,51
	ESM	23,58	6,00	0,00	0,05	0,06

Conclusiones

Los resultados revelan el potencial de la inoculación bacteriana en la mejora de la tolerancia fisiológica de *Fragaria x ananassa* al estrés inducido por la imposición de déficit nutricional. Esta repuesta se reflejó en una mayor capacidad de asimilación de CO_2 y una mayor estabilidad de su aparato fotoquímico en términos cualitativos (mantenimiento de eficiencias y tasa de transporte de electrones) y cuantitativos (mayores niveles de clorofilas y carotenoides). Sin embargo, la inoculación bacteriana no fue capaz por si sola de cubrir las necesidades nutricionales totales de las plantas, ya que el desarrollo de las plantas no alcanzó los niveles registrados en las plantas control. Este es un estudio inicial sobre el papel que promueve este consorcio bacteriano en el crecimiento de las plantas de *Fragaria x anassa* cv. Rociera en una situación extrema de privación completa de la fertilización

química. Todavía se necesitan futuras investigaciones que permitan una mayor comprensión del efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas en el desarrollo de la fresa y las respuestas desencadenadas.

Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado en el marco de los proyectos US-1262036 convocatoria de Proyectos I+D+i FEDER Andalucía 2014-2020 y PDC2021-120951-I00 convocatoria Prueba de Concepto 2021 financiados por la Consejería de Economía, Conocimiento, Empresa y Universidad de la Junta de Andalucía y el Ministerio de Ciencia e Innovación, respectivamente.

Bibliografía

Chookietwattana, K., Maneewan, K., 2012. Selection of efficient salt-tolerant bacteria containing ACC deaminase for promotion of tomato growth under salinity stress. Soil and Environment. 31, 30-36.

Martínez-Ferri, E., Soria, C., Ariza, M. T., Medina, J. J., Miranda, L., Domíguez, P., Muriel, J. L., 2016. Water relations, growth and physiological response of seven strawberry cultivars (Fragaria×ananassa Duch.) to different water availability. Agricultural Water Management. 164, 73-82. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.08.014.

Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 990, 87-92. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9

Glick, B. R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica. 963401. https://doi.org/10.6064/2012/963401

Green, B. R., Durnford, D. G., 1996. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47(1), 685–714. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.685

Lozano, D., Ruiz, N., Gavilan, P., 2016. Consumptive water use and irrigation performance of strawberries. Agricultural Water Management. 169, 44–51. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.02.011

Maxwell, K., Johnson, G., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. Journal of Experimental Botany. 51(345), 659–668. https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659

Mesa, J., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M. A., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., 2015. Endophytic cultivable bacteria of the metal bioaccumulator spartina maritima improve plant growth but not metal uptake in polluted marshes soils. Frontiers in microbiology. 6, 1450. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01450

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., Babalola, O. O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 33(11), 197. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9

Olivares, P. J., 2008. Fijación Biológica del Nitrógeno. http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/

Padilla, F., Miranda, J., Pugnaire, F., 2007. Early root growth plasticity in seedlings of three Mediterranean woody species. Plant and Soil. 296, 103–113. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9294-5

Patten, C. L., Glick, B. R., 2002. Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology. 68(8), 3795–801. https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002

Paul, D., Lade, H., 2014. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: A review. Agronomy for Sustainable Development. 34, 737–752. https://doi.org/10.1007/s13593-014-0233-6

Pérez-Romero, J. A., Barcia-Piedras, J. M., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., 2019. Impact of short-term extreme temperature events on physiological performance of Salicornia ramosissima J. Woods under optimal and sub-optimal saline conditions. Scientific Reports. 9(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37346-4

Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion. Journal of Biotechnology Advances. 17, 319-339. http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2

Ruzzi, M., Aroca, R., 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. Scientia Horticulturae. 196, 124–134. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.042

Seneviratne, S. I., Corti, T., Davin, E. L., Hirschi, M., Jaeger, E. B., Lehner, I., Orlowsky, B., Teuling, A. J., 2010. Investigating soil moisture-climate interactions in a changing climate: A review. Earth-Science Reviews. 99(3–4), 125–161. https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2010.02.004

Thakur, S., Mehta, K., Singh, D., 2018. Studies on the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth, physiological parameters, yield and fruit quality of strawberry cv. chandler. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 7, 383–387. 7-1-346-438.pdf (phytojournal.com)

Zaidi, A., Ahmad, E., Khan, M. S., Saif, S., Rizvi, A., 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. Scientia Horticulturae, 193, 231–239. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.020

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Estudio de caracterización de suelos contaminados con ceniza volcánica y forraje destinado a consumo animal en la zona de Bilbao-Ecuador

L. Carrera-Beltrán [1], I. Gavilanes-Terán [1], J. Idrovo-Novillo [1], V.H. Valverde-Orozco [1], T. Albán-Guerrero [1], S. Ruiz- Illapa [1], C. Paredes [2] y A.A. Carbonell-Barrachina [3]

[1] Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo EC060155-Riobamba (Chimborazo), Ecuador. E-mail: lourdes.carrera@espoch.edu.ec

[2] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3,2, 03312-Orihuela (Alicante)

[3] Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández EPS-Orihuela, Ctra. Beniel km 3,2, 03312-Orihuela (Alicante)

Resumen

La parroquia de Bilbao es una comunidad ubicada en la Provincia de Chimborazo (Ecuador), en las faldas del Volcán Tungurahua, una zona considerada altamente agrícola y ganadera que fue gravemente afectada por el proceso eruptivo en el periodo comprendido entre 1999 y 2016. El objetivo de esta investigación fue caracterizar los suelos contaminados con ceniza volcánica, así como el forraje destinado a consumo animal en la zona de Bilbao con la finalidad de evaluar la contaminación producida por la caída de ceniza. Para el estudio se tomaron 9 muestras tanto de suelos como de forraje (planta completa). El muestreo se realizó mediante el método probabilístico aleatorio simple en puntos equidistantes y georreferenciados (GPS) a lo largo de todo el sector afectado. En las muestras de suelo se analizó pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), textura, densidad real y aparente y macronutrientes (N, P, K); así como pH, CE, MO, aniones y macronutrientes en muestras vegetales. En todas las muestras se determinó la concentración de metales pesados. Los principales resultados del análisis de suelos indicaron un pH ligeramente ácido (5,43 y 6,5), una CE inferior a 0,2 dS m-1, la densidad aparente varió entre 1,07 y 1,36 g cm-3, mientras la densidad real presentó valores entre 2,38 a 2,57 g cm-3 mostrando un bajo contenido de MO (entre 0,12 % y 0,61 %). El 78% de muestras presentan una textura franco-arenosa y la evaluación de los metales pesados Hg, Cd, Se, As y Pb dieron como resultado concentraciones inferiores a los valores establecidos en la Normativa Ecuatoriana vigente. Los análisis de forraje indican un pH ácido (entre 5,94 y 6,25), valores altos de CE (entre 3,13 y 8,29 dS m-1), alto contenido de MO (87,16-90,16 %) y valores considerables de macronutrientes. En general, los resultados de los diferentes parámetros corresponden a valores propios de un suelo de origen volcánico, en cuanto a los valores de metales pesados en las muestras analizadas son inferiores a los establecidos en la normativa ecuatoriana, solo el Pb en muestras vegetales presentó valores superiores a lo establecido en la normativa ecuatoriana NTE INEN-CODEX 193 (2013).

Palabras clave: Volcán Tungurahua, contaminación, metales pesados, macronutrientes, Bilbao

Characterization study of soils contaminated with volcanic ash and forage destined for animal consumption in the area of Bilbao-Ecuador

Abstract

The parish of Bilbao is a community located in the Chimborazo Province (Ecuador), on the slopes of the Tungurahua Volcano, an area considered highly agricultural and livestock that was seriously affected by the eruptive process in the period between 1999 and 2016. The objective of this research was to characterize the soils contaminated with volcanic ash, as well as the forage destined for animal consumption in the Bilbao area in order to evaluate the contamination produced by falling ash. For the study, 9 samples of both soils and forage (complete plant) were taken. Sampling was carried out using the simple random probabilistic method in equidistant and georeferenced points (GPS) throughout the affected sector. The soil samples were analyzed for pH, electrical conductivity (EC), organic matter (OM), texture, real and apparent density and macronutrients (N,

P, K); as well as pH, EC, MO, anions and macronutrients in plant samples. In all samples the concentration of heavy metals was determined. The main results of the soil analysis indicated a slightly acidic pH (5.43 and 6.5), an EC lower than 0.2 dS m-1, the apparent density varied between 1.07 g cm-3 and 1.36 g cm-3, while the real density presented values between 2.38 to 2.57 g cm-3 showing a low content of OM (0.12% and 0.61 %%). 78% of the samples have a sandy-loam texture and the evaluation of the heavy metals Hg, Cd, Se, As and Pb resulted in concentrations lower than the values established in the current Ecuadorian Regulations. Forage analyzes indicate an acid pH (5.94 and 6.25), high EC values (3.13 and 8.29 ds m-1), high OM content (87.16 and 90.16%) and considerable macronutrient values. In general, the results of the different parameters correspond to the values of a soil of volcanic origin, as far as the values of heavy metals in the analyzed samples are lower than those established in the Ecuadorian regulations, only the Pb in plant samples presented values higher than what is established in the Ecuadorian regulations NTE INEN-CODEX 193 (2013).

Keywords: Tungurahua volcano, pollution, heavy metals, macronutrients, Bilbao

Introducción y/o Justificación

El Volcán Tungurahua inició su último proceso eruptivo en septiembre de 1999 (Bustillos et al., 2014) (luego de ocho décadas de inactividad) y finalizó en marzo 2016 (Darack, n.d.). Su actividad fue variable, desde eliminación de lava, actividad sísmica a corto y largo plazo, deformaciones en el suelo (Muller et al., 2018), emisiones de gases, escorrentía y ceniza que incluso alcanzaron varios kilómetros de altura en dirección oriente - occidente (Battaglia et al., 2019), llegando hasta comunidades andinas (Samaniego et al., 2011; Bustillos et al., 2014; Instituto Geofísico, 2021). Una de las comunidades más afectadas fue la parroquia Bilbao, que se ubica en las faldas del Volcán Tungurahua y presenta zonas onduladas por la influencia del volcán y por las cuencas del río Chambo, las quebradas se encuentran cubiertas de lahares y flujos piroclásticos. El mayor peligro de la parroquia lo constituye su ubicación en la zona de riegos de erupción. Caracterizada por tres pisos climáticos que permiten el cultivo de varios productos (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016) y que fueron afectados durante el proceso eruptivo.

La ceniza volcánica contiene granos de arena, y partículas muy finas como polvo (Sánchez Carrillo, 2017), óxidos de Si, Al, Fe, Mg, Ca, Na, K; pudiendo contener metales pesados como V, Pb, Cr, Co, Ni y Zn (Galán Huertos & Romero Baena, 2008). Estudios de la ceniza del volcán Tungurahua (erupción 2010) demostraron la presencia de óxidos de Si, Al, Fe y en menor porcentaje el CaO, MgO, Na_2O, K_2O (Acuña Mondragón, 2017; Battaglia et al., 2019). Las Parroquias Guanando y la Providencia cercanas al Volcán indican concentraciones de Cd y As inferiores a los límites permisibles (Basantes & Hernández, n.d.).

Por otro lado, el suelo constituye una barrera protectora de los medios hidrológicos y biológicos; filtra, descompone, neutraliza o almacena contaminantes y evita su biodisponibilidad, esto depende del contenido de materia orgánica (MO), del pH, potencial de oxidación (Eh), textura, proporción y tipo de minerales de arcilla, carbonatos, entre otros; siendo particular el poder depurador de un suelo, sin embargo cuando la concentración de una o varias sustancias incrementa, este actúa como contaminado y es fuente de contaminantes (Galán Huertos & Romero Baena, 2008; Rodriguez Eugenio et al., 2019). El desplazamiento de metales pesados en suelos es muy bajo, generalmente se localizan en los primeros horizontes (Galán Huertos & Romero Baena, 2008). En bajas concentraciones el Fe, Zn, Mn y Cu constituyen micronutrientes, mientras el Cd, Cr, Pb y As son tóxicos (Mothes et al., 2015; Tóth et al., 2016; Ballesta, 2017; Medina-Pizzali et al., 2018; Rai et al., 2019), y pueden ser una fuerte amenaza para los animales, plantas y el ser humano (Briceño et al., 2020). El As se dispersa en la atmósfera como trióxido de As (Medina-Pizzali et al., 2018). Los suelos de la zona cercana al Volcán Tungurahua contienen gran cantidad de ceniza volcánica, y se presume que poseen cierto porcentaje

de metales pesados además de otros componentes característicos de la ceniza volcánica. Según los estudios de Briceño (2020) en el Cantón Quero (sector afectado por la ceniza del volcán Tungurahua), el contenido de Cd, Pb, Ni, Sr, Co, Cu y Zn y nutrientes (K, Mg, Fe y Mn) en muestras de suelo y cebolla de rama, presentaron valores por debajo de los máximos permitidos según normativa ecuatoriana, mientras la ingesta del metal por la cebolla de rama resultó independiente de la fracción biodisponible. Los procesos eruptivos del Volcán Tungurahua se extendieron por 17 años, sin embargo, no existe información sobre los impactos ambientales ocasionados a la Parroquia Bilbao-Ecuador, por lo que existe la necesidad de desarrollar el presente estudio y analizar el estado actual de la parroquia, con el fin de establecer los impactos ambientales generados.

Material y Métodos

Área de estudio

El Volcán Tungurahua está situado a 5023 m.s.n.m en la Cordillera Oriental de los Andes ecuatorianos localizado a 35 km de la ciudad de Ambato – Ecuador (Le Pennec et al., 2012; Briceño et al., 2020). Su último proceso eruptivo duró 17 años, y presentó diferentes intensidades, las erupciones más fuertes ocurrieron en julio y agosto de 2006, febrero de 2008, mayo y diciembre 2010, julio y octubre de 2013 y febrero y abril de 2014 (Neuberg et al., 2018) y duraron varias horas e incluso días, con emisiones de flujos piroclásticos, columnas eruptivas altas (5-13 km sobre el cráter), seguidas por caída de ceniza y escorrentía (Le Pennec et al., 2012) generando evacuaciones, muertes y varias afectaciones a la agricultura, infraestructura y ganadería (Samaniego et al., 2011). Las fases moderadas ocurrieron a fines de 1999, agosto 2001, octubre 2003, junio 2004, entre otras y duró varios días o semanas, se caracterizó por la desgasificación intensa, explosiones estrombolianas, chorros de lava y emisiones sostenidas de cenizas, las columnas eruptivas alcanzaban de 2 a 8 km, afectando la agricultura y el turismo. Las fases menos intensas generaron emisión de cenizas a una altura inferior a 3 km, sin afectar áreas pobladas y cultivadas (Samaniego et al., 2011).

La parroquia Bilbao, perteneciente al Cantón Penipe - provincia de Chimborazo, se localiza en las faldas del Volcán Tungurahua, Flanco Norte, a 42 km de Riobamba, fue muy afectada por el proceso eruptivo del volcán, durante la primera década de erupción se depositó material volcánico sobre el suelo hasta en 1 m y en otros casos entre 0,40 y 0,70 m. La capa suave del subsuelo no supera los 15 m de profundidad y luego se encuentra la roca sólida que conforma la estructura base del volcán, la ganadería decreció notablemente por la presencia de ceniza contaminada sobre los pastos.

El proceso de investigación inició con el reconocimiento de la zona afectada por la caída de ceniza del Volcán Tungurahua en la Parroquia Bilbao e identificación de las unidades experimentales equidistantes que incluyó toda la zona ganadera de la parroquia. Posteriormente se procedió al levantamiento de la información socioeconómica mediante encuestas; los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis cuantitativo, comparativo, sistemático y organizado en frecuencias y porcentajes. Las coordenadas geográficas, temperatura y humedad de los puntos de muestreo se determinaron mediante un GPS y un termohigrómetro, y posteriormente fueron ingresados al programa Google Maps.

Análisis físico químicos

Los análisis se realizaron en muestras de suelo compuestas (aproximadamente de 2 kg) (Plants et al., 2009; Rai et al., 2019), recolectadas según el método probabilístico aleatorio simple, por triplicado a una profundidad de entre 40-50 cm; en las mismas unidades experimentales se tomaron aproximadamente 2 kg de muestras vegetales (raíz + parte aérea). Las muestras de suelos fueron secadas, procesadas, tamizadas a la luz de una malla de 2 mm y analizadas mediante métodos de investigación mixto. Las muestras vegetales fueron lavadas, secadas y molidas a un tamaño menor a

50 mm. En las muestras de suelo se determinó densidad real y aparente por volumetría en diluciones 1:5, p/v y 3:5, p/v respectivamente, textura por el método del hidrómetro (1:10 p/v); pH y conductividad eléctrica (EC) en una suspensión de suelo-agua mediante potenciometría (proporción 2:5 p/v) y conductimetría (proporción 1:2 p/v), respectivamente (Gupta et al., 2012). El porcentaje de materia orgánica (OM %) se determinó por calcinación a 430 °C durante 16 horas. La determinación de P y K inició con digestión ácida (H2SO4) (Paneque-Pérez, 2010), posteriormente el P se determinó por espectrofotometría UV-VIS, mientras el K por fotómetro de llama. El N tanto en suelos como en forraje se determinaron en un ANALIZADOR ELEMENTAL DE COMBUSTIÓN DIRECTA (EUROVECTOR EA3000); la determinación de metales pesados inició con la digestión ácida por calcinación - vía húmeda y posterior análisis por EAA de llama. En las muestras vegetales se determinó pH por potenciometría (dilución 1:10, p/v), conductividad eléctrica por conductimetría (dilución 1:10, p/v) (Gupta et al., 2012); porcentaje de materia orgánica (MO%) por calcinación a 430°C durante 24 horas, los aniones libres del tejido vegetal (nitratos y sulfatos - dilución 1:100 y fosfatos - dilución 1:1000) se evaluaron en un extracto acuoso (1:100 p/v) se determinaron por espectrofotometría; mientras la concentración de cloruros se determinó por argentometría (Gupta et al., 2012); el análisis de cationes Na, K y P inició con una digestión ácida (H2SO4) y posterior dilución 1:200 (Paneque-Pérez, 2010), el Na y K fueron analizados por fotometría de llama, mientras el P se realizó por espectrofotómetro UV-VIS, los metales pesados Pb y Cd se determinaron por absorción atómica previa digestión ácida y dilución 1:100; mientras el As, Se y Hg se determinaron por absorción atómica con generador de hidruros. Los resultados de los análisis fueron de carácter cualitativo y cuantitativo, y fueron sometidos a análisis estadístico considerando un diseño experimental completamente al azar.

Análisis estadístico

En los resultados de los análisis de suelos y vegetales se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), para comprobar si existe diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de cada parámetro estudiado. Para valores de F-ANOVA con cierta significación, se empleó la prueba Tukey-b como prueba post-hoc para evaluar las diferencias entre las medias específicas, mostrándose los resultados mediante letras para una probabilidad del 95% ($p < 0,05$). Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS 22.

Resultados y Discusión

En septiembre de 1999, el Volcán Tungurahua inició su último proceso eruptivo mismo que duró 17 años, afectando gravemente a toda la zona ubicada hacia su costado occidental, entre ellas la Parroquia Bilbáo, adyacente al Parque Nacional Sangay. Debido a la elevada actividad del Volcán Tungurahua y su continua caída de ceniza, la mayor parte de la vegetación fue afecta puesto que esta quemó sus copas y los secó (la ceniza en ocasiones caía caliente y en otras con substancias tóxicas), perdiendo masa con el tiempo. La biodiversidad (flora y fauna endémicas) presentó bajos niveles de conservación, por lo que situaron a algunas especies en peligro de extinción; los recursos naturales forestales como arbustos (especies del alto andino) y árboles de pecho alto como eucalipto o eucaliptus (Eucalyptus), motilón (Hyeronina alchornoidesesde) y Dacryodes cupularis (Burseraceae), y matorrales resistentes a la altura y frío (zona alta - 3600 m) fueron afectados; las riberas del río Chambo que baña la parte baja de Bilbao, fue limitada en su flora y fauna silvestres por la contaminación causada por la erupción del volcán Tungurahua. Especies perennes de pastos para ganado (común en el sector) que no requiere de mayores cuidados han reemplazado especies endémicas. Cantidades apreciables de cultivos y frutales, ganado vacuno, ovino, porcino y especies menores, así como infraestructura, vías de comunicación sufrieron afectaciones graves, por lo cual, la población fue gravemente afectada en su economía (Rosero Aguilar et al., n.d.). De acuerdo a las encuestas realizadas en la Parroquia Bilbao el 56 % de los habitantes se dedica a la agricultura y

ganadería, el 35% solo la agricultura, y el 9% solo la ganadería, siendo los principales cultivos el tomate de árbol, fréjol y pasto; un 41% posee ganado de raza cruzada; el 73% es alimentado con pasto. Para el estudio se identificaron 9 unidades experimentales que incluyen el Centro Parroquial, Motilones, Yuibug y Santa Cruz y abarcan toda la zona ganadera, la georreferenciación se realizó con un GPS de precisión y un termohigrómetro y posteriormente fueron registrados en el programa Google Maps. Los puntos de muestreo se indican en la figura 1



Figura 1. Mapa de ubicación de la zona de estudio en la Parroquia Bilbao.Fuente: Grupo de investigación GAIBAQ (2021).

Los suelos analizados presentan diferencias significativas en cuanto a sus propiedades físicas, los valores de pH oscilaron entre 5,43 y 6,53 que corresponden a suelos moderadamente ácidos según referencia de SEMARNAT (2003), cuatro de las cinco muestras analizadas presentan valores inferiores a lo establecido en la Normativa Ambiental Ecuatoriana Vigente 097-A (6-8), siendo similares a los reportados por Zúñiga (2016), quien realizó estudios en cuatro cantones también afectados por la caída de ceniza del Volcán Tungurahua en la Región Sierra de Ecuador, los resultados se atribuyen a las actividades agropecuarias propias de la zona (crecimiento óptimo de pastos para ganado vacuno); los suelos con pH ácido pueden absorber minerales considerados agentes tóxicos (Al y Mn), presentan problemas para la retención de macroelementos (Ca, Mg y P), existe mayor solubilidad de diversos elementos incluidos los metales pesados que pueden ser asimilados por las plantas (Mahecha-Pulido et al., 2015).

Tabla 1. Parámetros físico químicos y Macronutrientes en suelos

	pH	CE	% MO	Dr	Da	P	K	N
		(dS m^{-1})		(g cm^{-3})	(g m^{-3})	(g kg^{-1})	(g kg^{-1})	(g kg^{-1})
S01	5,43 a	0,13 f	0,61 h	2,38 a	1,07 a	0,322 d	0,735 a	3,500a
S02	6,53 f	0,09 e	0,36 g	2,39 a	1,30 e	0,278 b	1,012 f	2,700a
S03	6,17 d	0,04 b	0,32 e	2,44 d	1,25 d	0,252 a	1,024 g	2,100a
S04	5,85 b	0,06 cd	0,34 f	2,51 e	1,18 b	0,246 a	0,852 c	3,300a
S05	6,01 c	0,06 d	0,20 c	2,41 b	1,36 f	0,300 bcd	0,962 d	4,700a
S06	5,99 c	0,05 c	0,34 f	2,57 h	1,25 d	0,255 a	0,974 e	9,000b
S07	6,15 d	0,24 g	0,26 d	2,53 f	1,36 f	0,283 bc	1,154 h	10,200b
S08	6,27 e	0,02 a	0,12 a	2,55 g	1,30 e	0,307 cd	0,979 e	9,300b
S09	5,95 c	0,06 d	0,18 b	2,43 c	1,22 c	0,307 cd	0,774 b	9,10b
F ANOVA	301,25 ***	1887,88 ***	8180,57 ***	3452,12 ***	150,23 ***	28,27 ***	4675,03 ***	23,81 ***

MO: Materia orgánica. CE: conductividad eléctrica. Dr: densidad real. Da: densidad aparente. CV: Coeficiente de variación. ***: significancia a $p < 0.001$. Los valores promedio en una fila seguidos de diferente letra indican que son significativamente diferentes a p (prueba de Tukey).

La CE presenta valores inferiores a los establecidos en la normativa ecuatoriana vigente (0,2 dS m^{-1}), categorizados por SEMARNAT (2003) como efectos despreciables de salinidad, característica de suelos afectados por la actividad volcánica y sin mayor actividad antropogénica (Cobb et al., 2000; Navarro-Aviñó et al., 2007), la muestra S07 es un caso particular que indica un suelo ligeramente salino (0,24 dS m^{-1}); con valores altos de salinidad se ve afectado el crecimiento de cultivos por bioacumulación de metales como Zn, Cu, B y Mn (Méndez et al., 2009), al verse afectado el equilibrio suelo-agua (Guía para La Evaluación de La Calidad y Salud del Suelo, 1999), la MO (%) constituye la reserva de nitrógeno y demás nutrientes del suelo e influye en su estructura y porosidad (Broquen et al., 2004), los valores analizados se encuentran entre 0,12 % y 0,61 %, considerados como muy bajos según datos de SEMARNAT (2003) e inferiores a los reportados por Zúñiga (2018). Un pH y contenido de materia orgánica bajos incrementa la biodisponibilidad de metales para la planta debido a la falta de formación de complejos organometálicos, lo que favorece que los metales sean absorbidos por la raíz (Voijant Tangahu et al., 2011; Bravo Realpe et al., 2014; Bornø et al., 2019). De acuerdo con la EPA-2017, valores superiores a 4,5% en MO contribuyen a la formación de complejos organometálicos (Francis, 2000), influenciados por el pH y CE del suelo (Galán Huertos & Romero Baena, 2008). La densidad real se encuentra entre 2,58 y 2,37 g cm^{-3}, mientras que la densidad aparente presenta valores entre 1,07 y 1,36 g cm^{-3}, considerados relativamente bajos y característicos de suelos provenientes de cenizas volcánicas según lo expresado por Zúniga (2018) y Broquen (2004), pero superiores a los mencionados por Nanzyo (2002) (0,9 g cm^{-3} o menor). La fracción granulométrica para el 78 % de los suelos analizados presenta una textura franco-arenosa mientras el 22 % corresponde a suelos francos, con mayor contenido de arena, seguido de limo y bajas proporciones de arcilla (datos no mostrados), acorde a los suelos de origen volcánico (Zúñiga et al., 2018). En las cercanías del volcán se presentan cantidades mayores de partículas gruesas mientras las finas son trasladadas por el viento a grandes distancias (Zúñiga et al., 2018). Los macronutrientes analizados también presentan diferencias significativas entre las muestras analizadas. El N se encuentran entre 2,100 y 10,200 g kg^{-1} valores superiores a los promedios de 0,0208 g kg^{-1}, 0,0152 g kg^{-1}, 0,0471 g kg^{-1} y 0,0594 g kg^{-1} reportados por Zúñiga (2018) para Quero, Pelileo, Tisaleo y Baños de Agua Santa respectivamente, bajas concentraciones pueden deberse a pérdidas por lixiviación por la alta porosidad de estos suelos (Zúñiga et al., 2018). El P presentó valores entre 0,246-0,322 g kg^{-1}, superiores a los encontrados por Zúñiga (2018) de 0,0970 g kg^{-1}, 0,1205 g kg^{-1}, 0,0606 g kg^{-1} y 0,1050 g kg^{-1}, para Quero, Pelileo, Tisaleo y Baños, respectivamente. Los valores de K oscilaron entre 0,735-1,154 g kg^{-1}, que corresponde a valores superiores a 0,095-0,601 g kg^{-1} reportados por Briceño (2020) y 0,0624 g kg^{-1}, 0,078 g kg^{-1}, 0,573 g kg^{-1} y 0,9204 g kg^{-1} para Quero, Pelileo, Tisaleo y Baños encontrados por Zúñiga (2018), quien señala que los suelos volcánicos no presentan deficiencia en potasio debido a que las cenizas y rocas tienen un alto contenido de esos minerales.

Tabla 2. Concentración de metales pesados en suelos.

MUESTRA	Pb (mg kg^{-1})	Cd (mg kg^{-1})	Hg (*u*g kg^{-1})	As (*u*g kg^{-1})		Se (*u*g kg^{-1})	
S01	< 10	< 0,5	< 100	< 75	a	394,52	b
S02	< 10	< 0,5	< 100	114,44	b	< 300	a
S03	< 10	< 0,5	< 100	256,66	e	< 300	a
S04	< 10	< 0,5	< 100	272,74	f	< 300	a
S05	< 10	< 0,5	< 100	168,99	c	< 300	a
S06	< 10	< 0,5	< 100	465,13	h	< 300	a
S07	< 10	< 0,5	< 100	328,99	g	467,09	d
S08	< 10	< 0,5	< 100	474,15	i	476,38	e
S09	< 10	< 0,5	< 100	247,99	d	401,92	c
F ANOVA				26728,86 ***		119793,23 ***	

CV: Coeficiente de variación. ***: significancia a $p < 0.001$.

Los resultados de As y Se presentan diferencias significativas en los suelos analizados; la concentración de As varió entre 114,44 ug kg^{-1} y < 75 ug kg^{-1} resultando inferiores a los valores referenciales de la normativa ecuatoriana (12 mg kg^{-1}) a diferencia de los valores elevados encontrados en Papallacta-Ecuador presentados por Jiménez (2018) (20,7 mg kg^{-1} y 43 mg kg^{-1}); el selenio presentó valores comprendidos entre 394,52 ug kg-1 y < 300 ug kg^{-1}, encontrándose los dos metales (As y Se) dentro de los límites permisibles por la normativa ecuatoriana vigente (12 mg kg^{-1} y 1 mg kg^{-1}, respectivamente); para Pb, Cd, Hg no se reportan valores debido a que estos se encuentran por debajo de los límites de detección el equipo (10 mg kg^{-1}, 0,5 mg kg^{-1} y 10 ug kg^{-1}, respectivamente), de acuerdo con esto, los valores de Pb son inferiores a los establecidos en la normativa ecuatoriana (19 mg kg^{-1}) y 50 mg kg^{-1} normativa estadounidense EPA; de igual manera para el Cd las concentraciones establecidos por la EPA de 0,35 mg kg^{-1} (Francis, 2000) y 0,5 mg kg^{-1} (REFORMA TEXTO UNIFICADO LEGISLACION SECUNDARIA, MEDIO AMBIENTE, LIBRO VI, Decreto, n.d.), según Acuerdo Ministerial 097, caso similar ocurre con el mercurio cuyo límite establecido es de 0,1 mg kg^{-1}, los estudios de Briceño (2020) indican valores de 0,09-0,13 mg kg^{-1} para Cd; 0,64-1,28 mg kg^{-1} para Pb manteniéndose dentro de los estándares de calidad ambiental establecidos por la normativa ecuatoriana para suelos volcánicos. Cabe señalar que el uso de los suelos corresponde a pastoreo y no existe adición de fertilizantes, por tanto, la presencia de metales pesados se puede relacionar con los procesos eruptivos del Volcán Tungurahua. En las mismas unidades experimentales se tomaron muestras vegetales de Solanum tuberosum, el análisis estadístico demuestra valores con diferencia significativa, pudiendo encontrarse en más de un subgrupo. Los valores de pH se encuentran entre 5,94 y 6,25 es decir ligeramente ácidos, los valores de CE se encuentran entre 3,13 y 8,29 dS m^{-1} (niveles de salinidad bajos); el % de MO se estableció entre 87,16 y 89,36 %. La s concentraciones de K varían entre 7,666 y 16,916 g kg-1, el Na 17,396- 265,910 g kg-1 y el P 0,070-0,148; de acuerdo a las concentraciones requeridas expresadas por Pérez (2017) el K (10- 50 g kg^{-1}) se encuentra dentro de los límites requeridos, el Na (0,01 g kg^{-1}) es considerablemente elevado y el P (2 g kg^{-1}) es deficiente; finalmente el nitrógeno presentó valores entre 1,080 – 21,00g kg^{-1}, todos los valores mostraron diferencias significativas en muestras de la misma especie, y sectores cercanos en la misma parroquia.

Tabla 3. Parámetros físico químicos y Macronutrientes en forraje.

Muestra	pH	CE ds m^{-1}	%MO	K (g kg^{-1})	Na (g kg^{-1})	P (g kg^{-1})	N (gkg^{-1})
F01	5,96 b	6,83 d	87,78 ab	13,416 de	191,356 bc	0,148 e	21,000 abc
F02	6,13 d	5,11 c	88,14 b	12,166 cd	91,950 ab	0,084 bc	3,630 c
F03	6,25 e	6,65 d	87,43 a	14,166 e	265,910 c	0,092 c	1,770 abc
F04	6.16 d	5,40 c	88,75 c	9,416 ab	17,396 a	0,075 ab	1,780 abc
F05	6,11 c	5,09 c	89,36 c	8,666 a	83,252 ab	0,122 d	1,630 ab
F06	6,14 d	4,98 c	90,16 d	11,166 bc	91,950 ab	0,122 d	2,130 abc
F07	5,94 b	8,29 e	87,16 a	16,916 f	141,653 abc	0,076 ab	3,230 bc
F08	5,76 a	3,13 a	87,62 ab	7,666 a	257,212 c	0,070 a	1,080 a
F09	5,76 a	3,96 b	89,08 c	7,916 a	108,103 ab	0,073 a	1,680 ab
	879,206 ***	216,167 ***	44,271 ***	60,104 ***	11,356 ***	220,269 ***	5,218 *

CV: Coeficiente de variación. ***, *: significancia a $p < 0.001$, p <0,5 respectivamente.

Los resultados de Pb y Se indican diferencias significativas entre las muestras. El Pb presenta valores superiores a los establecidos en NTE INEN-CODEX 193 (2013) (Pb = 0,1 mg kg^{-1}) en seis de las nueve muestras analizadas, estos valores se encuentran entre 2,26 y 33,97 mg kg^{-1}; de igual manera se encontró Se en seis de nueve muestras analizadas variando sus valores de 309,30 a 1299,03 ug kg^{-1}, mientras el Cd, Hg y As presentan valores por debajo de los límites de detección del equipo utilizado

(<0,5 mg kg^{-1}, < 100 ug kg^{-1} y < 75 ug kg^{-1} respectivamente), a diferencia de los valores reportados por Briceño (2020) (0,0188 - 0,030 mg kg^{-1} para Cd y 0,040-0,058 mg kg^{-1} para Pb). Los aniones analizados también presentan diferencias significativas en los resultados obtenidos a excepción de los NO_3^{-1} que presentan similitudes. El NO_3^{-1} presentó valores de 600 a 1240 mg kg^{-1}, PO_4^{-3} con valores entre 3160 y 9240 mg kg^{-1}, Mixquititla y Villegas (2016) indican que una deficiencia de fosfatos afecta el correcto desarrollo y crecimiento de las plantas; los SO_4^{-2} con valores entre 1600 y 7200 mg kg^{-1}; y Cl^{-1} con valores entre 13495,82 y 24492,41 mg kg^{-1} considerados altos en forrajes (8000-12000 ppm) según Albionlabservices, (2011), una elevada concentración produce toxicidad en la planta (Martin, 2018).

En la rizosfera del material vegetal se analizó metales pesados, los resultados para Pb, Cd, Hg y As fueron inferiores al límite de detección del equipo (10 mg kg^{-1}, 0,5 mg kg^{-1}, 100 ug kg^{-1} y 75 ug kg^{-1}, respectivamente) mientras los valores de Se están comprendidos entre 330,27 y 574,57 ug kg^{-1}, presentando diferencias significativas entre las diferentes unidades experimentales.

Tabla 4. Metales pesados y aniones en Forraje.

Muestra	Pb (mg kg^{-1})	Cd (mg kg^{-1})	Hg (*u*g kg^{-1})	As (*u*g kg^{-1})	Se (*u*g kg^{-1})	NO_3^{-1} (mg kg^{-1})	PO_4^{-3} (mg kg^{-1})	SO_4^{-2} (mg kg^{-1})	Cl^{-1} (mg kg^{-1})
F01	2,26 b	< 0,5	< 100	< 75	314,33c	1080 a	6120 c	4000 ab	20493,65 cde
F02	0,00 a	< 0,5	< 100	< 75	< 300a	960 a	4160 ab	4800 ab	17994,42 bcd
F03	0,00 a	< 0,5	< 100	< 75	428,51e	720 a	5960 c	7200 b	22992,87 ef
F04	3,79 d	< 0,5	< 100	< 75	1299,03g	720 a	3680 a	2000 a	17994,42 bcd
F05	0,00 a	< 0,5	< 100	< 75	316,00d	640 a	8440 d	2400 a	15495,20 ab
F06	29,32 f	< 0,5	< 100	< 75	< 300a	1160 a	3400 a	7200 b	16994,73 abc
F07	33,97 g	< 0,5	< 100	< 75	< 300a	1240 a	5000 b	7200 b	24492,41 f
F08	3,00 c	< 0,5	< 100	< 75	309,30b	960 a	9240 d	4800 ab	21493,34 def
F09	11,07 e	< 0,5	< 100	< 75	444,37f	600 a	3160 a	1600 a	13495,82 a
F-ANOVA	21677,331 ***				1183,629 ***	333 NS	106,044 ***	7,851 **	22,119 ***

CV: Coeficiente de variación. ***, **: significancia a $p < 0.001$, p <0,01 respectivamente.

Conclusiones

La parroquia de Bilbao es una comunidad ubicada en las faldas del volcán Tungurahua, una zona altamente agrícola y ganadera, gravemente afectada por el proceso eruptivo, sus suelos presentan un pH moderadamente ácido, baja CE, sinónimo de efectos despreciables de salinidad en el suelo, densidad real, densidad aparente y MO% bajas característica de suelos de origen volcánico y una textura predominante franco-arenosa, condiciones que no favorece el óptimo crecimiento de forraje para alimentación del ganado de la zona. Los metales pesados Hg, Cd, Se, As y Pb analizados presentaron concentraciones bajas (inferiores a los límites permisibles). El forraje de igual manera presentó un pH ácido, baja conductividad eléctrica, alto contenido de MO, valores considerables de macronutrientes y bajos niveles de metales pesados a excepción del Pb que supera los límites recomendados por NTE INEN-CODEX 193 (2013). El principal impacto ambiental fue la caída de ceniza volcánica, ya que se desencadenan impactos negativos sobre la química, bioquímica y microbiología del suelo, así como, en plantas y cultivos de las zonas estudiadas.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación ha sido ejecutado bajo el proyecto titulado: “Evaluación de biodisponibilidad de metales pesados y su grado de afectación en las zonas de influencia del volcán

Tungurahua y estudio de bioacumulación en suelos y productos derivados de actividades agropecuarias", ejecutándose bajo la colaboración del Grupo Asociado de Investigación en Biotecnología, Ambiente y Química (GAIBAQ) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo-Ecuador, el Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH) y el Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández EPS-Orihuela. Por lo que los autores agradecen el apoyo brindado a esta investigación.

Bibliografía

Acuña Mondragón, K. E. (2017). Análisis de las cenizas del Tungurahua (granulométrico, de componentes y químico) en la primera fase eruptiva de 2010 (enero-marzo).

Ballesta, J. (2017). Introduccion a la contaminación de los suelos. 3–16.

Battaglia, J., Hidalgo, S., Bernard, B., Steele, A., Arellano, S., & Acuña, K. (2019). Autopsy of an eruptive phase of Tungurahua volcano (Ecuador) through coupling of seismo-acoustic and SO 2 recordings with ash characteristics. Earth and Planetary Science Letters, 511, 223–232. https://doi.org/10.1016/j.epsl.2019.01.042

Bornø, M. L., Müller-Stöver, D. S., & Liu, F. (2019). Biochar properties and soil type drive the uptake of macro- and micronutrients in maize (Zea mays L.). Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 182(2), 149–158.

Bravo Realpe, I. del S., Arboleda Pardo, C. A., & Martín Peinado, F. J. (2014). Efecto de la calidad de la materia

orgánica asociada con el uso y manejo de suelos en la retención de cadmio, en sistemas altoandinos de Colombia. Acta Agronómica, 63(2), 164–174. https://doi.org/10.15446/ACAG.V63N2.39569

Briceño, J., Tonato, E., Silva, M., Paredes, M., & Armado, A. (2020). Metal content evaluation in soils and edible tissues of Allium Fistulosum L. on crops near the Tungurahua volcano. La Granja, 32(2), 114–126.

Broquen, P., Candan, F., Lobartini, J. C., & Girardin, J. L. (2004). Relaciones entre el carbono orgánico y propiedades edáficas y del sitio en suelos derivados de cenizas volcánicas, sudoeste de neuquén (argentina). Ciencia Del Suelo, 22(2).

Bustillos J, Le-Pennec, Samaniego P, Eychenne J, Troncoso L, Ordóñez J, & Gonza, T. (2014). Estudio de los depósitos de ceniza del volcán Tunguharahua-2010: Transición del estilo eruptivo. In REVISTA EPN (Vol. 33, Issue 2).

Cobb, G. P., Sands, K., Waters, M., Wixson, B. G., & Dorward-King, E. (2000). Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. Environmental Toxicology and Chemistry, 19(3), 600–607. https://doi.org/10.1002/etc.5620190311

Darack, E. W. W. (n.d.). Ecuador's Tungurahua Volcano: The "Throat of Fire" - Agricultural & Environmental Science Collection - ProQuest. Agricultural & Environmental Science Collection. Retrieved March 22, 2021, from https://search-proquest-com.publicaciones.umh.es/agricenvironm/docview/200703812/40E3CA774964D97PQ/2?accountid=28939

Ministerio del Ambiente del Ecuador. Revista de Investigación Ambiental. Edición digital No2. Edición Anual 2016.

Francis, M. (2000). Background Report on Fertilizer Use, Contaminants and Regulators. DIANE Publishing.

Francisco Rosero Aguilar PRESIDENTE, M., Jorge Anibal Aguilar Mariño Vocal, I., Rosero Vocal, M., & Rosero Vocal, R. (n.d.). Gobierno Autónomo Descentralizado de la Parroquia Bilbao.

Galán Huertos, E., & Romero Baena, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo. (1999).

Gupta, Yaduvanshi, N. P. S., & Gupta, S. K. (2012). Standard Methods for Analysis of Soil Plant and Water.

Instituto Geofísico, 2021. Tungurahua. https://www.igepn.edu.ec/tungurahua (acceso 23 mayo 2021)

Jiménez Jiménez, P. A. (2018). Diagnóstico de la presencia y contaminación por arsénico en el suelo y agua de consumo en la parroquia Papallacta (Bachelor's thesis, Quito, 2018.).

Le Pennec, J.-L., Ruiz, G. A., Ramón, P., Palacios, E., Mothes, P., & Yepes, H. (2012). Impact of tephra falls on Andean communities: The influences of eruption size and weather conditions during the 1999–2001 activity of Tungurahua volcano, Ecuador. Journal of Volcanology and Geothermal Research, 217–218, 91–103. https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2011.06.011

Mahecha-Pulido, J. D., Trujillo-González, J. M., Torres-Mora, M. A., & Agrónomo, I. (2015). Heavy metal content in agricultural soil from the Ariari region in the Meta department Conteúdo de metais pesados em solos agrícolas na região Ariari, Departamento de Meta. In Meta. Colombia (Vol. 19, Issue 1). Universidad de los Llanos.

Martín, Christoph. "Chloride: from Nutrient to Toxicant". Plant and Cell Physiology [en línea], 2018, 59, pp. 877–886. [Consulta: 28 de julio de 2021]. Disponible en: https://doi.org/10.1093/pcp/pcy071

Medina-Pizzali, M., Robles, P., Mendoza, M., & Torres, C. (2018). Ingesta de arsénico: el impacto en la alimentación y la salud humana. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, 35(1), 93–102. https://doi.org/10.17843/RPMESP.2018.351.3604

Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., & García, F. P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10(1), 29–44.

Ministerio del Ambiente de Ecuador (MAE). (2015). Anexo 2 Del Libro Vi Del Texto Unificado De Legislacion Secundaria Del Ministerio Del Ambiente: Norma De Calidad Ambiental Del Recurso Suelo Y Criterios De Remediación Para Suelos Contaminados Norma (pp. 1–22). https://maeorellana.files.wordpress.com/2015/11/anexo-2-suelo.pdf

Mixquititla, Gabriela; & Villegas. "Importancia de los fosfatos y fosfitos en la nutrición de cultivos". Acta Agrícola y Pecuaria [en línea], 2016, (México) 2(3), pp. 55-61. [Consulta: 11 de agosto de 2021]. ISSN 2448-7090. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6201359

Mothes, P. A., Yepes, H. A., Hall, M. L., Ramón, P. A., Steele, A. L., & Ruiz, M. C. (2015). The scientific-community interface over the fifteen-year eruptive episode of Tungurahua Volcano, Ecuador. Journal of Applied Volcanology, 4(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s13617-015-0025-y

Muller, C., Biggs, J., Ebmeier, S. K., Mothes, P., Palacios, P. B., Jarrín, P., Edmonds, M., & Ruiz, M. (2018). Temporal evolution of the magmatic system at Tungurahua Volcano, Ecuador, detected by geodetic observations. Journal of Volcanology and Geothermal Research, 368, 63–72. https://doi.org/10.1016/J.JVOLGEORES.2018.11.004

Navarro-Aviñó, J., Aguilar Alonso, I., & López-Moya, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Ecosistemas, 16(2), 1–9. https://doi.org/10.7818/re.2014.16-2.00

Neuberg, J. W., Collinson, A. S. D., Mothes, P. A., C. Ruiz, M., & Aguaiza, S. (2018). Understanding cyclic seismicity and ground deformation patterns at volcanoes: Intriguing lessons from Tungurahua volcano, Ecuador. Earth and Planetary Science Letters, 482, 193–200. https://doi.org/10.1016/J.EPSL.2017.10.050

Paneque-Pérez, V. M. (2010). Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Undefined.

Pérez, Fernando. Fisiología vegetal Parte III Nutrición mineral [en línea]. Perú: Universidad Nacional de Ucayali, 2017. [Consulta: 12 de mayo de 2021]. Disponible en: http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/3201/000026082L.pdf

Plants, T., Invertebrates, T., & Vertebrates, T. (2009). SOIL TOXICITY AND BIOASSESSMENT TEST METHODS FOR ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT.

Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K. H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. In Environment International (Vol. 125, pp. 365–385). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067

REforma Texto Unificado Legislacion Secundaria, Medio Ambiente, Libro VI, Decreto. (n.d.).

Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M. y Pennock, D. 2019. La contaminación del suelo: una realidad oculta. Roma, FAO.

Samaniego, P., Le Pennec, J. L., Robin, C., & Hidalgo, S. (2011). Petrological analysis of the pre-eruptive magmatic process prior to the 2006 explosive eruptions at Tungurahua volcano (Ecuador). Journal of Volcanology and Geothermal Research, 199(1–2), 69–84. https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2010.10.010

Sánchez Carrillo, E. P. (2017). Análisis mineralógico y multielemental de la ceniza volcánica, colectada en una hacienda en el sector de Machachi, por difracción de rayos X (XRD) y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), y sus posibles aplicaciones e impacto. PUCE.

SEMARNAT (2003). Acuerdo que establece las reglas de operación para el otorgamiento de Pagos del Programa de Servicios Ambientales Hidrológicos. Viernes, 3, 6-23. SGR. (2014). Programa de Prevención y Mitigación para Reducir el Riesgo por Diferentes Amenazas. Inf. téc. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M. R., & Montanarella, L. (2016). Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. Environment International, 88, 299–309. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.017

TUNGURAHUA - Instituto Geofísico - EPN. (n.d.). Retrieved May 23, 2021, from https://www.igepn.edu.ec/tungurahua

Voijant Tangahu, B., Rozaimah Sheikh Abdullah, S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. International Journal of Chemical Engineering, 2011, 31. https://doi.org/10.1155/2011/939161

Zúñiga, F., Buenaño, M., & Risco, D. (2018). Caracterización física y química de suelos de origen volcánico con actividad agrícola, próximos al volcán Tungurahua. Revista Ecuatoriana de Investigaciones Agropecuaria, 1(1), 5–10.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Influencia de la micorrización con *Glomus spp.* sobre sustancias farmacológicamente activas en el cultivo de *Cistus albidus* L. (*Cistaceae*)

D. Raus de Baviera [1], M. Losada-Echeberría [2], F. J. Álvarez-Martínez [2], F. Borrás-Rocher [3], E. Barrajón-Catalán [2], A. Ruiz Canales [4]

[1] Programa ReTos AAA – Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (CIAGRO), Carretera de Beniel Km 3.2. – 03312 Orihuela, email: daniel.raus@goumh.umh.es
[2] Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche – Universidad Miguel Hernández, Ed. Torregaitán, Av. Universidad, S/N – 03202 Elche.
[3]Dpto. Estadística, Matemáticas e Informática, Área de Estadística e Investigación Operativa, Universidad Miguel Hernández, Avda. Universidad s/n, 03202 Elche, Spain
[4] Dpto. Ingeniería, Área Agroforestal – Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (CIAGRO), Carretera de Beniel Km 3.2. – 03312 Orihuela.

Resumen

Las medicinas a base de plantas, como cualquier material vegetal, son principalmente el producto de procesos biológicos. La calidad y reproducibilidad que requieren los fitofármacos hacen imprescindible conocer con la mayor precisión posible los factores que influyen en el proceso y el resultado de la producción de plantas medicinales. Entre los factores de influencia más importantes se encuentran el contenido y la distribución de sustancias activas en los órganos de la planta durante su ciclo biológico. En este estudio, se investiga la influencia de la micorrización con *Glomus* spp. sobre la acumulación y distribución de sustancias farmacológicamente activas en cultivo de *Cistus albidus* L. durante su ciclo vegetativo. También se abordó la influencia de la fertilización y condiciones climáticas. Para ello, inoculamos *Glomus* spp. durante el período de crecimiento vegetativo en plantas de *C. albidus* de un año cultivadas en condiciones de campo en un clima semiárido en el sureste español. Se analizó la composición de las hojas frescas y sanas. Luego, se estudió la influencia de los diferentes parámetros sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante y se determinaron las relaciones entre todas las variables mediante análisis multicomponente. Los resultados obtenidos de este estudio mostraron un incremento de la concentración polifenólica y la actividad antioxidante en las hojas en asociación con un menor ataque de patógenos y otros cambios fisiológicos como una menor tasa de floración. Esto sugiere que la combinación entre micorrización con *Glomus* spp. y el uso de un fertilizante orgánico podría usarse para controlar la concentración de sustancias activas y especialmente el perfil fenólico de *C. albidus* y conducir a la supresión de enfermedades microbianas, protegiendo contra el ataque de hongos patógenos.

Palabras clave: *Cistus albidus*, micorrizas, *Glomus*, polifenoles, antioxidantes

Influence of mycorrhization with Glomus sp. on pharmacologically active substances in the culture of Cistus albidus L.

Abstract

Herbal medicines, like any plant material, are primarily the product of biological processes. The quality and reproducibility required for phytopharmaceuticals make it essential to know as precisely as possible the factors that influence the process and the result of the production of medicinal plants. Among the most important influencing factors are the content and distribution of active substances in the organs of a plant during its biological cycle. In this study, we investigated the influence of mycorrhization with *Glomus sp.* on the accumulation and distribution of pharmacologically active substances in *Cistus albidus* L. culture during its vegetative cycle. The influence of fertilization and climate conditions were also addressed. For this purpose, we inoculated *Glomus sp.* during the vegetative growth period on one-year-old *C. albidus* plants grown at field conditions in a semi-arid climate in southeast Spain. After harvesting, the fresh and sane leaves were analysed on their composition. Then, the influence of the different parameters on the content of bioactive compounds and the

antioxidant activity was studied and the relationships between all variables were determined through multicomponent analyses. Results obtained from this study showed an increment of polyphenolic concentration and antioxidant activity in leaves in association with a decreased pathogen attack and other physiological changes like a less flowering rate. This suggests that mycorrhization with *Glomus spp.* combined with organic fertilization could be used to control the concentration of active substances and especially the phenolic profile of *C. albidus* and lead to microbial disease suppression, protecting against *pathogen fungi attack.*

Keywords: *Cistus albidus*, mycorrhiza, *Glomus,* polyphenols, antioxidants

Introducción

La creciente necesidad de material vegetal de plantas medicinales puede conllevar intentar incrementar el rendimiento sin tener en cuenta la calidad de las plantas producidas. Existen evaluaciones y resúmenes sobre las ventajas, perspectivas y la viabilidad de emplear micorrizas arbusculares (MA) en cultivo de plantas medicinales. El desafío actual es aumentar el rendimiento total, manteniendo o mejorando la calidad. La calidad de la materia vegetal en términos de ingredientes farmacológicamente activos está influenciada no solo por factores abióticos como la luz, temperatura, humedad, fertilidad del suelo y técnicas de cultivo, sino también por factores bióticos como el ataque de herbívoros, estímulos relacionados con enfermedades y simbiosis con hongos micorrízicos (Szakiel *et al.*, 2011a, 2011b). El papel que desempeña la simbiosis MA en el desarrollo de las plantas, la resistencia a las enfermedades y tanto el rendimiento como la calidad del material vegetal hace que los hongos MA sean una alternativa potencial a los métodos existentes para mejorar el crecimiento de algunas plantas medicinales, especialmente porque actualmente se está buscando formas de cultivo naturales en la industria fitofarmaceutica (Toussaint *et al.*, 2007).

Los mecanismos por los cuales los hongos MA desencadenan cambios en la concentración de fitoquímicos en los tejidos vegetales aún no se conocen bien. La actividad de simbiosis MA promueve la absorción de fósforo (P), nitrógeno (N) y otros nutrientes minerales y, por lo tanto, contribuye a la acumulación de metabolitos secundarios en las plantas. En consecuencia, la simbiosis MA puede mejorar la síntesis de ciertos aminoácidos y contribuir a la acumulación de metabolitos específicos al promover la absorción de N (Smith & Read, 2009; Toussaint *et al*., 2007). Diferentes investigaciones han demostrado que la simbiosis con los hongos MA resulta en un aumento de terpenoides y sustancias fenólicas, que puede resultar de una mayor absorción de nutrientes minerales, especialmente P y N (Kapoor *et al.*, 2002a, 2002b; Toussaint *et al*., 2007). Los cambios en los metabolitos secundarios de las plantas micorrizadas pueden resultar, además, en cambios de los niveles de fitohormonas como citoquinina o giberelina *(Copetta et al*., 2006; Kapoor *et al*., 2007; Toussaint, 2007).

La simbiosis MA ofrece ventajas en las distintas condiciones del cultivo como el estrés hídrico y nutricional, así como por exceso de salinidad en condiciones de desertificación. Aquí es donde los hongos MA tienen el potencial de mejorar significativamente el rendimiento y la calidad de las plantas medicinales. En este contexto, es necesario realizar estudios en condiciones ambientales inherentes a las del área de cultivo con el fin de obtener las condiciones ideales en las que los hongos MA puedan mejorar la productividad de las plantas medicinales. El uso de instalaciones agrícolas para controlar los factores ambientales y proporcionar condiciones favorables para la simbiosis entre plantas medicinales y hongos MA favorecerá el rendimiento y la calidad de los materiales medicinales, en condiciones específicas de suelo y clima.

La especie de este ensayo, *Cistus albidus* L., se ha utilizado tradicionalmente en la medicina popular para una amplia gama de propósitos. En el Mediterráneo occidental, esta especie se ha empleado desde la antigüedad ya sea como infusión, decocción o ungüentos, para la prevención y el tratamiento de diferentes trastornos y enfermedades. Estudios etnobotánicos revelan que las partes aéreas de *C.*

albidus ejercen una actividad antimicrobiana natural (Bouamama et al., 1999; Loizzo et al., 2013) así como efectos neurológicos (Mulet, 1991). Estudios científicos actuales validan su fuerte actividad antimicrobiana (Bechlaghem *et al.*, 2019; Tomás-Menor *et al.*, 2013).

Material y Métodos

Material vegetal, inóculo micorrízico y sustrato de cultivo

Se recolectaron semillas de *C. albidus* de plantas madre seleccionadas del Parque Regional El Valle y Carrascoy cerca de la ciudad de Murcia (37° 50′ N, 1° 16′ E). Después de la esterilización ($KMnO_4$) y la germinación, se sembraron en bandejas (desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.5%) que contenían sustrato esterilizado mezclado con vermiculita y perlita (V:V:V =1:1:1). Después de que desarrollaron de 3-6 hojas, las plántulas se trasplantaron a bolsas de cultivo (20 cm de diámetro, 20 cm de profundidad rellenas de tierra procedente de la Rambla de Béjar (una mezcla de arena de río y suelo arcilloso). Las cantidades de N total, P disponible y potasio (K) en el suelo fueron 701,12, 30,34 y 121,67 mg kg^{-1}, respectivamente (tabla 1).

Tabla 1. Análisis del suelo empleado en el establecimiento del cultivo.

arena	limo	arcilla	Clasif,	CE	MO	pH	N	P	K^+
%	%	%	(UDSA)	dS/m (1:5)	%		mg kg^{-1}	mg kg^{-1}	mg kg^{-1}
36,8	10,6	46,2	Arcilloso		6,4		701,12	30,34	121,67

Tabla 2. Composición del fertilizante orgánico empleado en el ensayo.

N		K_2O	MgO	Na	S	MO
total	disponible	total				
%	%	%	%	%	%	%
3	0,13	4	0,3	0,9	0,4	20

Diseño experimental

El cultivo experimental se estableció en las instalaciones experimentales del Cortijo de las Peñas de Béjar, Puerto Lumbreras, España (470 m de altitud sobre el nivel del mar) (37° 50′ N, 1° 16′ E). La precipitación media anual es de 295 mm y la temperatura media anual es de 15,9 ºC. La ubicación pertenece a la zona climática semiárida.

El experimento se llevó a cabo de diciembre de 2020 a julio de 2021. Para ello se seleccionaron un total de 400 plántulas de *C. albidus* L. con tendencias de crecimiento uniformes y se trasplantaron en bolsas de cultivo de polietileno (LPDE) que contenían aproximadamente 5 kg de tierra de rambla cuyo único tratamiento fue la eliminación de piedras a través de un tamizado (10 mm). Después del trasplante, se mantuvo el suministro de agua regular hasta que las plántulas crecieron de manera estable (aproximadamente 90 días).

Una vez establecido el cultivo, se dividió en dos grupos de 50 contenedores cada uno. El primer grupo se inoculó con *Glomus* spp. (*Glomus intraradices, Glomus aggregatum, Glomus mosseae, Glomus etunicatum*) con un contenido total en esporas y micelios de *Glomus* spp. del 1% y el segundo sirvió de control. El grupo inoculado recibió un total de dos tratamientos de inoculación espaciados un mes entre cada uno (13 de marzo y 16 de abril de 2021) con 30 mg de *Glomus* spp. disuelto en 30 ml de agua destilada para cada bolsa de cultivo aplicado directamente al suelo, próximo al tallo. El grupo de

control no recibió tratamiento y solo se regó con 30 ml de agua por bolsa. Adicionalmente, la mitad del grupo inoculado y el grupo de control (cada uno con 100 plantas) fueron tratados dos veces con fertilizante orgánico espaciados un mes entre cada tratamiento. La primera fertilización fue el 29 de marzo de 2021 con 0,30 ml de fertilizante por bolsa de cultivo disueltos en 100 ml de agua. Las plantas de control recibieron solo el suministro de agua de 100 ml. El tratamiento se repitió el 30 de abril. El fertilizante orgánico empleado no contenía fósforo para evitar la disminución de los niveles de colonización de micorrizas descrito en anteriores estudios (Duan et al., 2010; Smith & Read, 2009) ya que el sustrato del ensayo tenía un contenido en P medio-alto.

Posteriormente, se dividieron los dos grupos de forma que finalmente quedaron cuatro grupos de 25 repeticiones cada uno. Cada bolsa de cultivo contenía 4 plantas de *C. albidus*. De forma que cada grupo estuvo compuesto por 100 vegetales.

De esta división resultaron los grupos control (CONT), inoculado + fertilizado (INOC+FERT), fertilizado (FERT) y el grupo inoculado (INOC).

El riego solo se aplicó cuando el contenido hídrico del suelo cayó por debajo del 20% de la capacidad máxima de campo. La capacidad máxima de campo se determinó de acuerdo con el método informado por la FAO.

Procesamiento de extractos

Se produjeron dos tipos de extractos de *C. albidus* en los laboratorios del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) mediante los disolventes agua y hexano como se describe en (Barrajón-Catalán et al., 2011).

El material vegetal se recolectó el 12 de mayo y el 15 de julio de 2021 por la mañana antes del amanecer. Se seleccionaron cuatro hojas frescas y sanas de la misma posición de las plantas de cada bolsa de cultivo y se limpiaron mediante aire a presión para su posterior procesamiento. Para ello, el material vegetal se trituró utilizando un molino mecánico hasta un tamaño máximo de 2 mm. Los polifenoles se extrajeron por un lado con agua destilada a una temperatura de 50°C y, por otro lado con hexano a temperatura ambiente (25ºC) tal y como se describe en (Barrajón-Catalán et al., 2011)) Los extractos fueron caracterizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-Ms) como describe en (Barrajón-Catalán *et al.*, 2011; Tomás-Menor *et al.*, 2013) y se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Para cada grupo (CON, INOC+FERT, INOC, FERT) se preparó tres repeticiones.

Determinación del contenido fenólico total

El contenido fenólico total de los extractos se midió utilizando el método de equivalencia de ácido gálico (GAE) en placas de 96 pocillos. Primero, se mezclaron 10 µL de cada muestra con 50 µL de reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu (Huang et al., 2005). Después de 1 min, se agregaron a la mezcla 100 µL de solución de Na_2CO_3 (20%, p/v) y 840 µL de agua destilada. La reacción se mantuvo en oscuridad durante 30 min. La absorbancia de la placa se midió a 700 nm usando un espectrofotómetro (BioTek Synergy HTX, Vermont, EE. UU.). Previamente se preparó una curva estándar de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) Utilizando soluciones de concentración conocida en agua. Los datos de absorbancia obtenidos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 6. Los resultados se expresaron en términos de equivalentes de ácido gálico (g GAE $(100\ g)^{-1}$ de extracto de planta).

Medidas de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), expresado en mmol $(100g)^{-1}$, se realizó como se describió anteriormente (Barrajón-Catalán *et al*., 2011).

Análisis del área foliar

El área foliar se midió con el programa ImageJ 1.53k (National Institute of Health, EE. UU.) para una media de 35 hojas por grupo, recolectadas en la misma posición de las plantas.

Análisis de correspondencia múltiple (ACM)

Se utilizó un ANOVA de dos vías para determinar la relación entre polifenoles, antioxidantes y los tratamientos del cultivo durante las dos observaciones. Para ello, se probaron múltiples comparaciones. Las diferencias se consideraron significativas a p <0,05.

Resultados y Discusión

Las condiciones climáticas durante el período de medición fueron típicas de zonas con clima mediterráneo seco. La intensidad solar y la temperatura aumentaron progresivamente de enero a julio. Las plantas del ensayo estuvieron sometidas a varios factores de estrés abiótico (falta de agua, altas temperaturas e intensidad solar) durante los meses de junio y julio, y mostraron una serie de cambios morfológicos.

Cambios morfológicos en hojas

El estrés abiótico provocó reducciones significativas (P <0.05) en el área foliar desde mayo a julio. El área medio por grupo se redujo entorno a un 60% para todos los grupos excepto para las plantas inoculadas que solo se redujo en un 30% (Figura 1). No obstante, se desarrollaron y expandieron hojas nuevas en los brotes laterales, lo que compensó la biomasa foliar perdida a partir de mediados de mayo por la abscisión de las hojas de la primera fase de desarrollo (diciembre a mayo). Con el primer episodio de estrés estival a finales de junio, el desarrollo de los dolicoblastos y braquiblastos se ralentizó y con ello se redujo el desarrollo de las hojas. El número de hojas por planta no aumentó y no se observaron diferencias significativas (P> 0.05) en este parámetro de junio a julio. Las hojas nuevas formadas durante la segunda fase de desarrollo (a partir de mayo) fueron más gruesos y más pequeños.

Con respecto a los cambios en el área foliar de las plantas de ensayo cabe mencionar que *C. albidus* es una planta marcescente cuyas hojas se desprenden de forma acropética de forma que las hojas recolectadas para las muestras no pertenecían a la misma fase de desarrollo. Como las hojas fueron recogidas en la misma posición (tercer piso), tomada desde el ápice, las hojas recogidas en julio, aún se encontraron en una posición superior en mayo.

En general, las hojas de las muestras tomadas en mayo y julio presentaban poca diferencia entre si. Visualmente no se identificó diferencia de color de las hojas intactas. Se observó que las hojas del grupo inoculado tuvieron una relación ancho-longitud menor que las de los otros grupos. No obstante, en ambas fechas, en el análisis visual de las muestras, una vez molidas, se notó una clara diferencia de color, destacando las muestras INOC y FERT+INOC por un color verde más intenso y oscuro que el resto. Lo cual puede estar relacionado con un aumento del contenido en clorofila y agua para las plantas micorrizadas como se reportó para otras especies (Baslam *et al.*, 2013; Nowak, 2004). No obstante, puede estar relacionado con el desarrollo de los tricomas que cubren la superficie de las hojas exhibiendo un denso vello compuesto por pelos glandulares y no glandulares que pueden ser individuales o estelares.

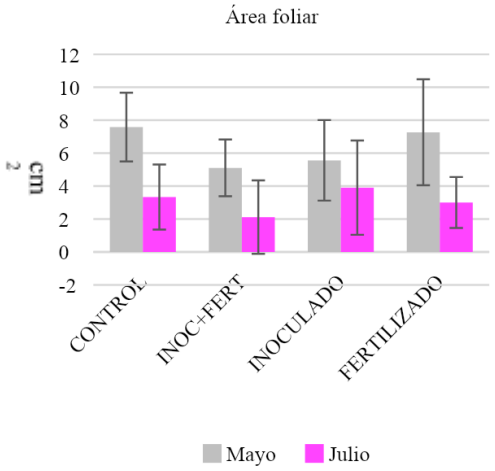


Figura 1. Evolución del área foliar entre las fechas de observación.

Un análisis visual de los tricomas mostró que los glandulares se presentan mayoritariamente de manera individual mientras que los no glandulares se presentaron en su mayoría agrupados en forma de estrella compartiendo la misma base que conecta con la superficie de la hoja. Adicionalmente, de forma aislada, también se encontraron tricomas estelares glandulares. Los tricomas glandulares miden aproximadamente de 200 a 500 µm de largo y tienen en la punta una apertura por donde se excreta una resina en forma de gotitas. Existen estudios histoquímicos que han revelado la emisión de polifenoles a partir de tricomas estelares en *C. salvifolius* (Tattini *et al.,* 2007) y *C. creticus* (Chinou *et al.*, 1994; Demetzos *et al.*, 1989, 1995). De forma que sospechamos que puede ocurir lo mismo en *C. albidus.* Hemos observado, además, que las hojas jóvenes de *C. albidus* recogidas en primavera muestran una mayor proporción de tricomas estelares de color amarrillo-verdoso. Parece ser que estos tricomas son los responsables de transferir un color verde más intenso a las hojas primaverales comparado con las hojas recolectadas en verano que exhiben una mayor proporción de tricomas incoloras que transfieren un color más blanquecino al follaje veraniego. Los tricomas glandulares secretan tanto en primavera como en verano gotas incoloras totalmente transparentes. Sin embargo, los tricomas glandulares estelares, solo liberan su contenido una vez producida su rotura. De ahí nuestra hipótesis que los tricomas estelares pueden convertirse en glandulares en función de la necesidad de la planta de protegerse contra factores bióticos y abióticos. En caso de un ataque herbívoro secretan resina para su protección. En primavera, las hojas suelen ser más apetecibles para los herbívoros por ello las hojas producen una mayor proporción de tricomas glandulares que además tienen el efecto de aumentar la captación de los rayos solares que beneficia la fotosíntesis.

Contenido fenólico total y capacidad antioxidante

El contenido fenólico total de los extractos seleccionados se midió utilizando el método de equivalencia de ácido gálico (GAE) y se muestran en la Tabla 2. Los extractos acuosos de *C. albidus* mostraron contenidos fenólicos de entre 4,9 ± 5,79 a 21,11 ± 18,66 mg de GAE g^{-1} de extracto en la primera medición y para la segunda 28,4 ± 18,14 mg a 36,32 ± 7,95 mg de GAE g^{-1} de extracto. Los contenidos mostraron un aumento medio de entre las dos fechas de medición de 3,3 veces, correspondiendo el mayor aumento al grupo fertilizado con un 5,8 veces, seguido de los grupos CONT (3,2 veces), INOC+FERT (2,7 veces) y del grupo INOC (1,6 veces). El mayor contenido fenólico se observó en el grupo INOC+FERT. Sin embargo, el contenido fenólico total de los grupos INOC y INOC+FERT exhibieron los valores más altos con 33,59 y 36,32 mg GAE g^{-1} de extracto respectivamente. Los grupos CONT y FERT alcanzaron valores máximos en la segunda medición prácticamente iguales.

Por otro lado, el contenido fenólico con hexano con extracto, aportó unos resultados en contenido fenólico considerablemente más bajos para este disolvente en comparación con el extracto acuoso. El

mayor contenido se encontró en el grupo INOC+FERT seguido del inoculado. Los grupos CONT y FERT dieron el mismo resultado.

Teniendo en cuenta que las plantas sufrieron estrés hídrico limitado al 20% de la capacidad de campo, no pudieron exhibir la respuesta total a la falta de agua. De forma que el contenido en fenoles totales se quedaría debajo de su potencial en situaciones de estrés hídrico severo como fue demostrado para el caso de lechuga (Baslam & Goicoechea, 2012).

Tabla 2. Resultados de los análisis bioquímicos. Efectos de los distintos tratamientos sobre la capacidad antioxidante y los fenoles totales en extractos acuoso y de hexano de C. albidus. Todos los parámetros están basados en n = 3 réplicas.

Muestra	**Tratamiento**	**Fenoles totales (mg GAE g^{-1} extracto)**		**TEAC (mmol $(100\ g)^{-1}$ extracto)**	
		(H2O)	(hexano)	(H2O)	(hexano)
M1	CONTROL	8.89 ± 1.07	0.43 ± 0.39	9.92 ± 0.40	0.12 ± 0.12
	INOC+FERT	13.33 ± 2.45	4.1 ± 6.45	10.27 ± 0.27	0.09 ± 0.13
	INOCULADO	21.11 ± 18.66	0.00 ± 0.00	8.40 ± 1.64	0.48 ± 0.09
	FERTILIZADO	4.87 ± 2.96	0.34 ± 0.59	6.34 ± 2.02	0.49 ± 0.17
M2	CONTROL	28.38 ± 18.14	0.60 ± 0.82	8.42 ± 1.39	0.90 ± 0.27
	INOC+FERT	36.32 ± 7.95	1.45 ± 1.32	9.78 ± 1.66	1.08 ± 0.11
	INOCULADO	33.59 ± 3.88	0.94 ± 0.39	8.24 ± 1.04	1.21 ± 0.32
	FERTILIZADO	28.21 ± 7.72	0.60 ± 0.30	8.44 ± 0.14	0.90 ± 0.13

Los resultados del análisis de la capacidad antioxidante obtenidos a partir de los extractos acuoso y hexano se recogen en la Tabla 2. La capacidad antioxidante está fuertemente relacionada con los metabolismos primario y secundario. Los metabolitos secundarios con capacidad antioxidante son principalmente los compuestos polifenólicos. Sin embargo, hemos observado en el caso del extracto acuoso que la capacidad antioxidante y el contenido en fenoles totales no guarda relación entre sí. Esto puede deberse a que la actividad antioxidante no siempre va ligada a la concentración de polifenoles (Okawa *et al.*, 2001) o que por el contrario está ligada a polifenoles concretos que cambiar su concentración a lo largo del tiempo analizado. De forma que cuando se mide la capacidad de secuestrar radicales libres (ROS), es importante tener en cuenta la posición del grupo hidroxilo más que el contenido en polifenoles. Además, se encontraron diferencias significativas entre los extractos de material vegetal de los diferentes grupos de ensayo. Para el extracto acuoso, se observó un descenso de mayo a julio de la capacidad antioxidante para las plantas de todos los grupos excepto para las plantas fertilizadas (FERT) que mostraron un incremento del 33%. El valor máximo de 10,27 mmol $(100\ g)^{-1}$ de extracto se encontró en las plantas del grupo INOC+FERT en mayo. Por otro lado, en el caso de las muestras extraídas con hexano, nos encontramos con lo contrario, de mayo a julio aumentó la capacidad antioxidante para todos los grupos considerablemente. Sin embargo, los valores para este disolvente son mucho más bajos que para el extracto acuoso, siendo el máximo 1,21 mmol $(100\ g)^{-1}$ para el extracto de las plantas inoculadas.

El aumento observado en los polifenoles puede residir en una mejor disponibilidad de fósforo y/o nitrógeno debido a los MA (Kapoor *et al.*, 2002a, 2002b; Toussaint *et al*., 2007). Además, el efecto micorrízico sobre las fitohormonas, podría ser responsable de una mayor producción de estos metabolitos secundarios (Copetta *et al.*, 2006; Kapoor *et al.*, 2007; Toussaint *et al*., 2007). No

obstante, también puede ser que el alto contenido de P en el sustrato diera como resultado una baja tasa de micorrización siendo compensado por la disponibilidad de P en el sustrato. Por otro lado, se demostró que el fosfato soluble no afectó la frecuencia e intensidad de la micorrización (Temegne *et al*., 2017).

Conclusiones

Las diferencias en las concentraciones foliares de polifenoles en *C. albidus* siguieron un patrón estacional. Los factores de estrés estival tendieron a aumentar el contenido de polifenoles. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran variabilidad en general debido a los múltiples factores abióticos y bióticos que influyen en la biosíntesis de estos compuestos. De forma, que para la capacidad antioxidante no se ha podido obtener una conclusión clara. Estudios han demostrado que el estrés hídrico severo puede tener un efecto negativo en la síntesis de antocianinas en flores y polifenoles en las hojas (Sivak & Walker, 1986; Zubek *et al.*, 2012). Se precisará ampliar las investigaciones para aclarar este hecho.

En conclusión, la combinación de los efectos de la simbiosis con MA en el desarrollo de *C. albidus* junto con el empleo de fertilizantes permitió influir en el proceso de la biosíntesis de los polifenoles. Este hecho abre la posibilidad de poder "diseñar" el contenido en sustancias farmacológicamente activas de planta medicinal aumentando, al mismo tiempo, la calidad y rendimiento del material vegetal. Además, de forma indirecta, permite prevenir ataques de fitopatógenos mediante el incremento de los compuestos fenólicos. Futuros ensayos serán necesarios para determinar el grado de control que se podrá ejercer mediante una combinación adecuada de fertilización y MA.

Bibliografía

Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2011). A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship: Polyphenolic Characterization of *Cistus* Aqueous Extracts. *Phytochemical Analysis*, *22*(4), 303–312. https://doi.org/10.1002/pca.1281

Baslam, M., Garmendia, I., & Goicoechea, N. (2013). Enhanced Accumulation of Vitamins, Nutraceuticals and Minerals in Lettuces Associated with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF): A Question of Interest for Both Vegetables and Humans. *Agriculture*, *3*(1), 188–209. https://doi.org/10.3390/agriculture3010188

Baslam, M., & Goicoechea, N. (2012). Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. *Mycorrhiza*, *22*(5), 347–359. https://doi.org/10.1007/s00572-011-0408-9

Bechlaghem, K., Allali, H., Benmehdi, H., Aissaoui, N., & Flamini, G. (2019). *Chemical Analysis of the Essential Oils of Three Cistus Species Growing in North- West of Algeria*. *84*(3), 283–293.

Bouamama, H., Villard, J., Benharref, A., & Jana, M. (1999). Antibacterial and antifungal activities of Cistus incanus and C. monspeliensis leaf extracts. *Therapie*, *54*(6), 731–733.

Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., & Verbist, J. (1994). Cytotoxic and Antibacterial Labdane-Type Diterpenes from the Aerial Parts of *Cistus incanus* subsp. *Creticus*. *Planta Medica*, *60*(01), 34–36. https://doi.org/10.1055/s-2006-959403

Copetta, A., Lingua, G., & Berta, G. (2006). Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in Ocimum basilicum L. var. Genovese. *Mycorrhiza*, *16*(7), 485–494. https://doi.org/10.1007/s00572-006-0065-6

Demetzos, C., Loukis, A., Spiliotis, V., Zoakis, N., Stratigakis, N., & Katerinopoulos, H. E. (1995). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil of *Cistus creticus* L. *Journal of Essential Oil Research*, *7*(4), 407–410. https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698549

Demetzos, C., Mitaku, S., Hotellier, F., & Harvala, A. (1989). [Polyphenolic glycosides from Cistus creticus L. leaves]. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, *47*(5), 314–318.

Duan, T., Shen, Y., Facelli, E., Smith, S. E., & Nan, Z. (2010). New agricultural practices in the Loess Plateau of China do not reduce colonisation by arbuscular mycorrhizal or root invading fungi and do not carry a yield penalty. *Plant and Soil*, *331*(1–2), 265–275. https://doi.org/10.1007/s11104-009-0251-3

Gifi, A. (2014). *Nonlinear multivariate analysis*. John Wiley & Sons.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841–1856. https://doi.org/10.1021/jf030723c

Kapoor, R., Chaudhary, V., & Bhatnagar, A. K. (2007). Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in Artemisia annua L. *Mycorrhiza*, *17*(7), 581–587. https://doi.org/10.1007/s00572-007-0135-4

Kapoor, R., Giri, B., & Mukerji, K. G. (2002a). Glomus macrocarpum: A potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (Anethum graveolens L.) and Carum (Trachyspermum ammi (Linn.) Sprague). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *18*(5), 459–463. https://doi.org/10.1023/A:1015522100497

Kapoor, R., Giri, B., & Mukerji, K. G. (2002b). Mycorrhization of coriander (Coriandrum sativum L) to enhance the concentration and quality of essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *82*(4), 339–342. https://doi.org/10.1002/jsfa.1039

Loizzo, M. R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., & Tundis, R. (2013). Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five Cistus species essential oils. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *59*, 586–594. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.040

Mulet Pascual, L. (1991). *Estudio etnobotánico de la provincia de Castellón*. Diputación de Castellón.

Nowak, J. (2004). Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Organic Fertilization on Growth, Flowering, Nutrient Uptake, Photosynthesis and Transpiration of Geranium (Pelargonium hortorum L.H. Bailey 'Tango Orange. *Symbiosis*, *37*, 259–266.

Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., & Ono, M. (2001). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *24*(10), 1202–1205. https://doi.org/10.1248/bpb.24.1202

Sivak, M. N., & Walker, D. A. (1986). PHOTOSYNTHESIS IN VIVO CAN BE LIMITED BY PHOSPHATE SUPPLY. *New Phytologist*, *102*(4), 499–512. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1986.tb00826.x

Smith, S. E., & Read, D. J. (2009). *Mycorrhizal symbiosis* (3. ed., Repr). Elsevier, AP.

Szakiel, A., Pączkowski, C., & Henry, M. (2011a). Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*, *10*(4), 471–491. https://doi.org/10.1007/s11101-010-9177-x

Szakiel, A., Pączkowski, C., & Henry, M. (2011b). Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*, *10*(4), 493–502. https://doi.org/10.1007/s11101-010-9164-2

Tattini, M., Matteini, P., Saracini, E., Traversi, M. L., Giordano, C., & Agati, G. (2007). Morphology and Biochemistry of Non-Glandular Trichomes in Cistus salvifolius L. Leaves Growing in Extreme Habitats of the Mediterranean Basin. *Plant Biology*, *9*(3), 411–419. https://doi.org/10.1055/s-2006-924662

Temegne, N. C., Nkou Foh, T. D., Taffouo, V. D., Wakem, G. A., & Youmbi, E. (2017). Effect of mycorrhization and soluble phosphate on growth and phosphorus supply of Voandzou [Vigna subterranea (L.) Verdc.]. *LEGUME RESEARCH - AN INTERNATIONAL JOURNAL*, *of*. https://doi.org/10.18805/LR-388

Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Barrajón-Catalán, E., Roldán-Segura, C., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2013). Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish Cistus species. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 313–322. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.006

Toussaint, J.-P. (2007). Investigating physiological changes in the aerial parts of AM plants: What do we know and where should we be heading? *Mycorrhiza*, *17*(4), 349–353. https://doi.org/10.1007/s00572-007-0133-6

Toussaint, J.-P., Smith, F. A., & Smith, S. E. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza*, *17*(4), 291–297. https://doi.org/10.1007/s00572-006-0104-3

Zubek, S., Mielcarek, S., & Turnau, K. (2012). Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant Hypericum perforatum L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, *22*(2), 149–156. https://doi.org/10.1007/s00572-011-0391-1

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Especies de *Variovorax* asociadas al nódulo que mejoran el crecimiento y la nodulación de *Medicago sativa* en situaciones de estrés.

N.J. Flores-Duarte[1], J. Pérez-Pérez[1], Mesa-Marín. J[2], E. Mateos-Naranjo[2], S. Redondo-Gómez[2], E. Pajuelo[1], I.D. Rodríguez-Llorente[1], S. Navarro-Torre[1]

[1] Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla, e-mail: nflores@us.es
[2] Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla.

Resumen

La agricultura es sin duda una de las actividades más importantes para la humanidad. El aumento de la población mundial ha traído la necesidad de incrementar la producción de cultivos para el consumo, pero los suelos fértiles se están reduciendo cada vez más por el aumento de la contaminación ambiental, provocada por el mal uso de fertilizantes químicos y desechos de metales pesados, entre otros factores. Este hecho ha llevado a la búsqueda de soluciones, a través de la investigación científica, para recuperar suelos contaminados por metales pesados, los cuales ocasionan serios problemas cuando están presentes en altas concentraciones en el suelo, induciendo efectos negativos en las plantas, como la inhibición de la germinación. y el crecimiento, la alteración de las actividades fisiológicas y la disminución de las poblaciones microbianas que se encuentran en el suelo. Una de estas soluciones, que ya ha brindado resultados prometedores en la reducción de fertilizantes químicos, es el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) como inoculantes para mejorar el crecimiento de las plantas y aumentar la nodulación de las plantas leguminosas, que son excelentes candidatas para la recuperación de suelos y estuarios contaminados a través de la fijación de N2. En este sentido, el objetivo principal de este trabajo es investigar y verificar si dos endófitos del género *Variovorax* (*V. paradoxus* S110 y *V. gossypii JM*-310) con propiedades PGP (fijación de nitrógeno, producción de auxinas y sideróforos, formación de biofilms y actividad ACC desaminasa), actividades enzimáticas y tolerancia a los metales pesados, pueden provocar un aumento del crecimiento vegetal y favorecer la nodulación de *Medicago sativa* en situaciones de estrés por metales pesados. Para ello, se diseñó un experimento in vitro con medio BNM suplementado con As 30 µM y Cu 30 µM, así como un experimento en macetas con suelos contaminados en condiciones de invernadero controladas, utilizando en ambos ensayos Ensifer *medicae* MA11 como rizobio. Se realizaron comparaciones de la germinación de *M. sativa*, biomasa y nodulación de las plantas en ausencia y presencia de metales, con los siguientes tratamientos: 1) control sin inocular, (C-), 2) control inoculado con el rizobio, (MA11), 3) control inoculado con cada *Variovorax* (Vp y Vg, respectivamente), 4) co-inoculación con cada *Variovorax* junto al rizobio, (Vp+M y Vg+M), y 5) co-inoculación con el consorcio de ambos endófitos junto al rizobio, (CSV). Los experimentos duraron 20 días in vitro y 60 días en macetas. Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en la germinación, número de nódulos, biomasa aérea y de raíz de plantas crecidas inoculadas y co-inoculadas, tanto en presencia como en ausencia de metales, en comparación con las plantas no inoculadas. Las plantas inoculadas con el consorcio CSV mostraron un mayor número de semillas germinadas tanto en ausencia como en presencia de metales, con un 37% y 40%, respectivamente, en comparación con el control sin inocular. En cuanto a la nodulación, la inoculación con el consorcio mostró un 71,57% más nódulos en ausencia de metales, y un incremento de más del 400% en presencia de metales. Estos resultados pueden ser debidos a la presencia de la actividad de la ACC desaminasa en las bacterias utilizadas como inoculantes, ya que de esta forma se reduce el estrés causado por los metales pesados en las plantas.

Palabras clave: Leguminosas, metales pesados, PGPB, biorremediación, ACC desaminasa.

Variovorax species associated with the nodule that improve growth and nodulation of *Medicago sativa* in stressful situations.

Abstract

Agriculture is undoubtedly one of the most important activities for humankind. The increase in world population has brought the need to increase the production of crops for consumption, but fertile soils are increasingly being reduced due to the boost in environmental pollution, caused by the misuse of chemical fertilizers and heavy metals waste, among other factors. This fact has led to the search for solutions, through scientific research, to recover soils contaminated by heavy metals, which cause serious problems when they are present in high concentrations in the soil, inducing negative effects on plants, such as the inhibition of the germination and growth, the alteration of physiological activities and the decrease of microbial populations found in the soil. One of these solutions, which has already provided promising results in reducing chemical fertilizers, is the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) as inoculants to improve plant growth and increase the nodulation of legume plants, which are excellent candidates for the recovery of contaminated soils and estuaries through the fixation of N2. In this sense, the main objective of this work is to investigate and verify if two endophytes of the genus *Variovorax* (*V. paradoxus* S110 and *V. gossypii* JM-310) with PGP properties (nitrogen fixation, production of auxins and siderophores, formation of biofilms and ACC deaminase activity), enzymatic activities and tolerance to heavy metals, can cause an increase in plant growth and favor the nodulation of *Medicago sativa* in situations of heavy metal stress. For this, an *in vitro* experiment with BNM medium supplemented with 30 µM As and 30 µM Cu was designed, as well as an experiment in pots with contaminated soils under controlled greenhouse conditions, using Ensifer medicae MA11 as rhizobium in both tests. Comparisons were made of the germination of M. sativa, biomass and nodulation of the plants in the absence and presence of metals, with the following treatments: 1) uninoculated control, (C-), 2) control inoculated with rhizobium, (MA11), 3) control inoculated with each *Variovorax* (Vp and Vg, respectively), 4) co-inoculation with each *Variovorax* together with the rhizobium, (Vp + M and Vg + M), and 5) co-inoculation with the consortium of both endophytes next to the rhizobium, (CSV). The experiments lasted 20 days in vitro and 60 days in pots. The results obtained showed a significant increase in germination, number of nodules, aerial and root biomass of inoculated and co-inoculated grown plants, both in the presence and in the absence of metals, compared to the non-inoculated plants. The plants inoculated with the CSV *consortium* showed a higher number of germinated seeds both in the absence and in the presence of metals, with 37% and 40% increase, respectively, compared to the uninoculated control. Regarding nodulation, the inoculation with the consortium showed 71.57% more nodules in the absence of metals, and an increase of more than 400% in the presence of metals. These results may be due to the presence of ACC deaminase activity in the bacteria used as inoculants, since in this way the stress caused by heavy metals in the plants is reduced.

Keywords: Legumes, heavy metals, PGPB, bioremediation, ACC deaminase.

Introducción

La contaminación ambiental es uno de los mayores problemas del siglo XXI, que provoca día a día un cambio en nuestra sociedad, y, por tanto, en la investigación. La actividad industrial y minera arroja al ambiente metales tóxicos contaminantes tales como; cadmio Cd, arsénico As y cobre Cu, muy dañinos para la salud humana y para la mayoría de los seres vivos (Mesa *et al.,* 2015a). Las aguas residuales no tratadas, provenientes de minas y fábricas, llegan a los ríos, mientras los residuos industriales contaminan las aguas subterráneas, llegando de diferentes formas al suelo cultivable. Todo esto ha provocado un deterioro en los suelos, una disminución en el número de tierras cultivables y, por tanto, provoca un problema a nivel social, económico y ambiental. Entre los contaminantes, destacan los metales pesados presentes en estuarios nacionales como las marismas del Odiel o Río Tinto (Hudson-Edwards *et al.,* 1999). La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser degradables ni de forma química ni biológica que pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años (Herrera Marcano *et al.,* 2011), inhibiendo la actividad enzimática de los suelos, disminuyendo el crecimiento de las poblaciones de microorganismos, alterando la diversidad etc. Un método para reducir el uso de fertilizantes químicos y regeneración de estuarios contaminados por metales pesados es el uso de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB, plant growth promotion bacteria) este método se ha estudiado anteriormente y ha dado buenos resultados aportando algunos beneficios ya sea en la salud del suelo, en

la absorción de nutrientes o en la resistencia a estreses bióticos y abióticos, mejorando la productividad agrícola (McCully *et al.,* 2005). Se han establecido una serie de propiedades que deben presentar las bacterias para considerarse un PGPB de interés (de Souza *et al*., 2015) y usarse como inoculantes de plantas para promover su crecimiento. En estas propiedades incluyen la facilitación de la adquisición de nutrientes, como la fijación atmosférica de nitrógeno (Franche *et al.,* 2009), la producción de sideróforos (Burd et al., 2000), la solubilización de fosfato (Richardson *et al.,* 2011), la producción de fitohormonas, como las auxinas (Dutta *et al.,* 2017), la actividad ACC-desaminasa (Penrose y Glick, 2003; Esquiel – Cote et al., 2013) y la formación de biopelículas (Das et al., 2012), entre otros. Las leguminosas son buenas candidatas para adaptarse a los suelos degradados, afectados por la contaminación moderada de metales pesados ya que pueden acumular metales en las raíces (Neumann, *et al.,* 1998). Cada vez más estudios están centrándose en otros tipos de PGPB como son los llamados endófitos no rizobiales o bacterias asociadas al nódulo de leguminosas NAB del inglés (Nodule Associated Bacteria) (Rajendran et al., 2012). Estas bacterias no inducen la formación de nódulos, pero pueden colonizar los nódulos inducidos por diferentes cepas de rizobios y esta asociación es beneficiosa, mejorando la nodulación y el crecimiento de las plantas. Además, las bacterias asociadas a las plantas leguminosas, utilizadas para la fitorremediación, pueden contribuir a la tolerancia frente a contaminantes, el crecimiento, la absorción y la aceleración del proceso Pajuelo *et al*., (2020) y Navarro-Torre *et al.,* (2020). En un trabajo previo del grupo de investigación se seleccionó la cepa *Variovorax* sp. CT7.15 de los nódulos de *Calicotome villosa,* de suelos áridos y pobres en nutrientes*,* por su alto nivel de ACC desaminasa. Al usar dicha cepa como co-inoculante con rizobios mejoró el estado fisiológico de la planta y aumentó el contenido en nitrógeno (Bessadok *et al*., 2020). Por tanto, esto muestra los beneficios que algunas cepas de *Variovorax* podrían tener, asociadas al nódulo. La elección de ambas especies tipo *V. paradoxus* S110 y *V. gossypii* JM-310 (BCCM) se debe a su posición intermedia filogenéticamente respecto a la cepa CT7.15.

Material y Métodos

Bacterias y medios de cultivo utilizados

Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas de colecciones propias del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla (BIO-181) y de la colección Belgian Co-ordinated Collection of Microorganisms (BCCM). Para el trabajo experimental estas bacterias fueron nombradas de la siguiente forma: **Vg:** *V. gossypii***, Vp:** *V.paradoxus,* **MA11:** *E. medicae*. A continuación, se muestra en la siguiente tabla un resumen detallado de las bacterias utilizadas.

Tabla 1. Especies utilizadas en el desarrollo experimental y colección.

Especie	Cepa	Nº de colección	Colección	Medios de cultivo
Variovorax gossypii	JM-310	LMG 28869T	BCCM	TSA
Variovorax paradoxus	S110	LMG 1796T	BCCM	TSA
Ensifer medicae	MA11	-	BIO-181	TY

TSA: Tryptic Soy Agar (Intron Biotechnology). TY: Tryptone Yeast Extract (Vincent, 1970).

Determinación de propiedades promotoras del crecimiento de las plantas (PGP)

Las propiedades de PGP se determinaron básicamente como se describe en Andrades-Moreno et al. (2014), Navarro-Torre et al. (2016) y Mesa et al. (2015a y b). Para la fijación de nitrógeno, las bacterias se sembraron en medio NFB (caldo libre de nitrógeno) (Ding et al., 2005) y se incubaron durante 7 días a 28ºC. La existencia de crecimiento indica que las bacterias fueron capaces de fijar nitrógeno. La solubilización de fosfato en medio NBRIP se determinó como se describe en (Nautiyal et al., 1999). La aparición de un halo transparente alrededor de la placa indicaba que el cultivo bacteriano tenía la capacidad de solubilizar fosfatos. La producción de sideróforos se determinó por la aparición de un halo de color naranja alrededor de los halos en el medio CAS (Blue Chrome S), después de ser incubado durante 7 días a 28ºC (Schwyn y Neilands, 1987). Para determinar la presencia de actividad de la ACC desaminasa se hicieron cultivos líquidos de bacterias en 3 ml de TSB, e incubaron de 24h a 28ºC bajo agitación constante. Los cultivos bacterianos se transfirieron al medio de cultivo M9 y se añadieron 30 µL de ACC 0,5M. Todo este procedimiento se llevó a cabo modificando y siguiendo el método

propuesto por Penrose y Glick (2003). La formación de biopelículas (Biofilm) se midió comprobando la capacidad de adhesión en microplacas con 96 pocillos. Como lo describe (Mesa et al., 2015a). La producción de ácido 3- indol acético (IAA) se evaluó en un medio de caldo de nutrientes (Biolife, Italia) complementado con L-triptófano (100 mg/l) e incubado a 28ºC durante 72 horas en agitación continua. Luego, se añadió el reactivo Salkowski (Gordon y Weber, 1951) y se midió la densidad óptica a 535 nm utilizando un espectrofotómetro (Lambda25; Perkin Elmer, Estados Unidos).

Actividades enzimáticas

Las actividades de pectinasa y celulasa se examinaron según lo describen (Elbeltagy et al.,2000). La actividad de la quitinasa se realizó como se describe en (Mesa et al., 2015b). La actividad de amilasa se realizó en placas de agar almidón incubadas durante 7 días a 28ºC y reveladas con 10 ml de lugol. Las actividades de lipasa y proteasa se observaron por la presencia de halos alrededor de las bacterias después de la incubación en agar Tween y caseína, respectivamente, durante 7 días a 28ºC (Prescott, 2002). Con respecto a la actividad de DNAsa, las bacterias se incubaron 7 días a 28ºC en placas de agar de ADN. A continuación, se revelaron las placas con HCl 1 M. Se observaron halos en fondo oscuro en bacterias con actividad DNAsa.

Compatibilidad de bacterias en la co-inoculación

Las cepas Vg y Vp fueron cultivadas en 3 ml de medio líquidos TSB (Triptona soja), y el rizobio MA11 fue cultivado en 3 ml de cultivo liquido TY (Triptona extracto de levadura). Estos se incubaron durante 24 h a 28ºC en agitación constante, crecidas las cepas Vg, Vp y MA11 se les añadieron 100 ul de estos cultivos a 50 ml de TSB y Ty en un matraz se incubaron durante 24 h a 28ºC en agitación constante. Como lo describe (Vincent, 1970). La identificación de colonias correspondientes a las cepas Vg, Vp y MA11 mostraron la compatibilidad de las cepas en cultivos, lo que indica que podrían utilizarse en experimentos de co-inoculación.

Determinación de la máxima concentración tolerable de metales pesados

Se sembraron las bacterias en medios TSA con una concentración creciente de metales pesados como lo describe (Mesa et al., 2015a). Los metales utilizados en esta investigación son: As, Cd, Cu y Zn. La concentración mínima de metal pesado que se probó fue 0,125 mM, la siguiente concentración fue 0,2 mM y se va aumentando en 0,1 mM en cada pase hasta llegar a 1 mM, donde se pudo aumentar la concentración de metales pesados en mayor rango. La siembra de bacterias siempre se realizó desde la placa con menor concentración de metal a la de mayor y no desde la placa base, ya que, los genes encargados de la resistencia frente a metales son operones que se inducen en respuesta a la concentración de metal. Se utilizaron las siguientes soluciones stock: NaAsO2 1 M, CdCl2 1 M, CuSO4 1 M, ZnSO4 1 M. La resistencia se expresa como la concentración máxima tolerada por la bacteria que permite crecimiento visible.

Inoculación y germinación de semillas de alfalfa

Las semillas de alfalfa se esterilizaron siguiendo las indicaciones de Navarro-Torre et al. (2016) sumergiéndolas durante 10 min en etanol al 70% (v/v) y 30 minutos en hipoclorito de sodio al 3% (v/v), lavando con agua destilada estéril. En cada experimento se mantuvieron 50 semillas para cada tratamiento: sin inoculación, inoculadas con 10^8 células por mL de un cultivo de las bacterias individuales Vg y Vp, seguido de inoculaciones con Vg+MA11, inoculaciones con la misma cantidad de Vp+MA11, inoculaciones con el rizobio MA11 y finalmente, 50 semillas fueron co-inoculadas con un cultivo que contiene las tres bacterias seleccionadas con el rizobio (CSV) , al finalizar el proceso se colocaron semillas en placas con medio de cultivo agar agua al 0,9%, se emplearon 10 semillas por placa y 5 placas para cada tratamiento. Al cultivo de agar agua se le agrego mezcla de las siguientes soluciones de metales completamente estéril a una concentración de 30 µM: NaAsO2, CdCl2, CuSO4, ZnSO. El experimento se realizó por duplicado estableciendo las mismas condiciones tanto en presencia como en ausencia de metales. Para el experimento *in vitro* se utilizaron placas cuadradas de 12 cm con medio BNM, fueron agregadas 10 semillas por placa y 5 réplicas por tratamiento, con las mismas condiciones de tratamientos utilizadas en la evaluación de la germinación. A las placas con metal se añadió al medio una solución de NaAsO2 y Cu a una concentración de 30 µM, En cuanto al experimento realizado en

maceta, inoculados con las mismas condiciones que los experimentos anteriores, fueron utilizadas 8 macetas con 2 plántulas por macetas. Utilizando un suelo contaminado con metales pesados, procedente de las marismas del Río Odiel, Huelva.

Determinación de la biomasa

Para comprobar si existen diferencias significativas entre las plantas inoculadas con los diferentes co-inoculantes, se realizaron las siguientes medidas: primero se realizó un recuento del número de nódulos y se observó la morfología de estos en un estereoscopio (lupa), y por último se determinó el peso seco tanto de la parte aérea como de la raíz por separado. Para obtener el peso seco, se mantuvieron las plantas en la estufa a 80ºC durante 48h.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando "Statistica" versión 12.0 (Tuls, OK, Estados Unidos). Se implementó una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y al ser los datos normales, se evaluaron mediante One-way ANOVA (F-test), que permite comparar varios grupos en una variable cuantitativa. En este caso el número de réplicas es de 5.

Resultados y Discusión

Determinación de propiedades promotoras del crecimiento de las plantas (PGP)

La presencia de propiedades PGP de las bacterias es un aspecto crucial para su uso como inoculantes. Como se observa en la Figura 1A, las tres especies de bacterias presentaron actividades PGP, por lo que, pueden ser potencialmente útiles para mejorar el desarrollo vegetal ya que todas las actividades promotoras del crecimiento aumentan el rendimiento de los cultivos. Solamente el rizobio MA11 solubilizó fosfato. Y Vp y MA11formaron biofilm . Las tres bacterias (Vp,Vg y MA11), fueron capaces de producir sideróforos, fijar nitrógeno, producir ACC desaminasa y auxinas. Pero la diferencia se muestra en las concentraciones y cantidad de producción de cada una de las bacterias utilizadas en este experimento. La concentración de auxinas que ambas especies pueden producir. *V. gossypii* produjo 4,26 mg/L mientras que *V. paradoxus* produjo 2,11 mg/L y *E. medicae* MA11 produjo 1,76 mg/L. Como la concentración era mayor a 1 mg/L, la prueba se consideró positiva y, por tanto, las bacterias fueron productoras de auxinas. Las auxinas pueden aumentar el crecimiento, enraizamiento, nodulación y resistencia frente a patógenos (Dutta *et al.,* 2017). Ambas especies, a su vez, produjeron sideróforos. Para cuantificar la capacidad de producir sideróforos, se relacionó con el diámetro del halo que formaron en la placa. El halo formado por *V. gossypii* fue de 5 cm mientras que el de *V. paradoxus* fue de 4 cm y el de MA11 1,4 cm, por tanto, se obtuvo que *V. gossypii* es mejor productora de sideróforos, aunque tuvieron una actividad de producción similar con *V. paradoxus*. El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para plantas y microorganismos, ya que está involucrado en varios procesos biológicos importantes, como la fotosíntesis, la respiración, la biosíntesis de clorofila (Kobayashi *et al*., 2012) y la fijación de nitrógeno. Esta propiedad puede ayudar a ambas *Variovorax* a penetrar las raíces y competir con otros microorganismos por el establecimiento en las raíces (Kloepper *et al.,* 1980). La actividad de fijación de N2, *V. paradoxus* tuvo un crecimiento escaso, MA11 un crecimiento moderado y *V. gossypii* un crecimiento alto. Por tanto, el resultado sugirió que ambas especies de *Variovorax* son endófitos y podrían localizarse dentro del nódulo. Las tres bacterias fueron capaces de producir la actividad de ACC desaminasa. La actividad ACC desaminasa (ACCd) es una de las propiedades PGP más importante en el desarrollo de este proyecto, ya que, reduce los niveles de estrés de la planta. La formación de biofilms se encontró en *V. paradoxus* y MA11, la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm fue de 0,558 y 0,140 respectivamente, indicando que la concentración celular fue elevada y se formaron biofilms. Esta propiedad puede influir en diferentes aspectos en el desarrollo vegetal y asegura la correcta colonización de las raíces (Pérez-Montaño *et al*., 2014). En cuanto a la producción de sideróforos solamente MA11 fue capaz de producir sideróforos.

Las actividades enzimáticas (Figura 1B) de estas bacterias también pueden suponer una gran ventaja para su inoculación. En este caso, se observó como *V. gossypii* fue mucho más completa en cuanto a número de actividades que *V. paradoxus* y *E. medicae* ya que, 5 de las 7 actividades testadas estuvieron

presentes en esta especie, frente a una actividad de *V. paradoxus* y MA11, la actividad amilasa. Las actividades enzimáticas son importantes para penetrar en la planta (en el caso de los endofitos) y, también, para degradar sus residuos y adquirirlos como nutrientes, además de aumentar la resistencia contra patógenos (Joshi *et al.,* 2018). Por otra parte, las pectinas son mezclas complejas de polisacáridos que pueden llegar a constituir un tercio del peso seco de la pared celular, por tanto, la actividad pectinasa positiva en *V. gossypii* también puede permitir el acceso de las bacterias al tejido y ayudar a su movilidad. Debido a esta característica, *V.gossypii* tiene la capacidad de degradar las paredes celulares de ciertos microorganismos, a través de la producción de enzimas hidrolíticas, tales como lipasas, pectinasas, proteasas y ADNasas, que actúan fundamentalmente contra los hongos, y se conoce como biocontrol. Por otra parte, la actividad amilasa puede ser útil para ambas especies de *Variovorax* porque permite utilizar el almidón, principal reserva de energía en plantas, por su capacidad de degradar los enlaces 1,4-α-glucosídicos. Por tanto, las actividades enzimáticas positivas pueden tener beneficios para cultivos en ensayos de campo. En cambio, en una situación real estas actividades pueden llegar a ser muy útiles para aumentar la biomasa del inoculante debido al enfrentamiento con otros patógenos y bacterias que quieran colonizar la raíz de *M. sativa* en cuestión, además de reducir el número de patógenos que pueden causar enfermedades y afectar a la interacción entre *M. sativa* y *Variovorax.*

Determinación de la máxima concentración tolerable de metales pesados

En la figura 2 se pueden observar las concentraciones máximas que toleraron las bacterias para cada uno de los metales pesados. Cabe resaltar que la concentración mínima que se consideró tóxica fue de 0,125 mM. Las dos bacterias (Vg y Vp) resultaron multirresistentes y consiguieron crecer a elevadas concentraciones en comparación con MA11 que ha crecido a bajas concentraciones de metales, los metales utilizados fueron As, Cd, Cu y Zn, los contaminantes más presentes en las marismas de Odiel (Nieto *et al.,* 2007) y en otros estuarios contaminados. Se puede observar cómo tanto el arsénico como el cobre fueron tolerados de la misma forma por ambas especies de *Variovorax*, en cambio, en el zinc y en el cadmio hubo diferencias; siendo más resistente *V. gossypii* al cadmio y *V. paradoxus* al zinc. Esto sugirió que *V. gossypii* y *V. paradoxus* tienen similares mecanismos de resistencia a metales. Por otra parte, hay una gran diferencia de la resistencia al cadmio con el resto de los metales pesados, ya que, llega a ser hasta dos veces menor la concentración máxima que permite el crecimiento. La toxicidad de los metales pesados es la capacidad de causar efectos perjudiciales en los microorganismos y depende de la dosis. Por tanto, ambas bacterias pueden ser usadas como inoculantes en medios contaminados por metales pesados, ya que, las concentraciones suelen ser menores a las soportadas. Por ejemplo, en el estuario de Río Tinto las mayores concentraciones de As son de 23,5 mg/l y Cd 1,04 mg/l (Mesa et al., 2015a).

Inoculación y germinación de semillas de alfalfa

Las plantas de *M. sativa* inoculadas con el consorcio CSV mostraron un mayor número de semillas germinadas tanto en ausencia como en presencia de metales**,** con un 37% y 40%, respectivamente, en comparación con el control sin inocular, seguidas de las semillas inoculadas con cada una de las bacterias con el rizobio y el rizobio por separado. Se encontraron diferencias significativas en las semillas co-inoculadas con el consorcio, en comparación con las no inoculados SD (n = 5). (ANOVA; LSD test, $P < 0,05$). Lo que sugiere que las co-inoculaciones aumentan la tasa de germinación de las semillas de *M. sativa.* Gracias a la presencia de la actividad pectinasa en *V. gossypii,* ya que esta actividad permite romper la pared celular durante la germinación de semillas y en el crecimiento de la planta, también juega un papel importante en el control biológico con fitopatógenos.

Estudio de nodulación in vitro

Una vez se comprobó la resistencia a metales y las propiedades PGP, se procedió a la inoculación con las dos especies *Variovorax*. En general la nodulación se vio mejorada en las plántulas co-inoculadas en cuanto al experimento realizado en presencia de metales (Figura 3A) los resultados obtenidos del rizobio MA11 se observó un 7% de nodulo, Vp+MA11 obtuvo un 20% de nodulo, Vg+MA11 un 32% de nodulación y por ultimo las placas control el consorcio (CSV) presentaron un 41% de nodulación. En el experimento con ausencia de metales en el rizobio MA11 se observó un 14%, Vp+MA11 obtuvo un

26%, Vg+MA11 un 26% y por último la co-inoculadas con el consorcio (CSV) presentaron un 30% de nodulación (Figura 3B). El consorcio mostró un 71,57% más nódulos en ausencia de metales, y un incremento de más del 400% en presencia de metales. En la (Figura 4 A, B, C y D) se representan nódulos de tratamientos en ausencia de metales y en las (Figura 4 E, F, G y H) nódulos en presencia de metales. CSV (A, E), con MA11+VP (B, F), MA11+VG (C, G), MA11 (D, H). Es interesante remarcar que las dos especies de *Variovorax* tienen actividad ACC desaminasa, idóneas para disminuir el estrés causado por los metales pesados en las plantas en *M. sativa* en condiciones de contaminantes y permite potenciar su crecimiento (Chen et al., 2013), junto al resto de actividades PGP y actividades enzimáticas registradas. SD (n = 5). (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

Biomasa de las plántulas

Las plántulas co-inoculadas presentaron mayor biomasa de peso seco tanto en la raíz como en la parte aérea (Figura 5). Las plántulas de *M. sativa* con falta de co-inoculación se vieron afectadas en el desarrollo y crecimiento de la plántula. Por otro lado, la co-inoculación con el consorcio (CSV), tuvo un efecto positivo tanto en la parte aérea como en la raíz de las plántulas. Tanto en presencia de metales (A) como en ausencia (B). Se observa como las plantas que han crecido en presencia del metal tienen menor peso seco de raíz que aquellas que no lo han hecho; lo realmente interesante, es comprobar que hay una diferencia significativa en el consorcio CSV, seguido de las co-inoculaciones con cada *Variovorax con* MA11, con respecto a MA11 o sin inocular. SD (n = 5). (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$). MA11 al ser un rizobio, puede fijar nitrógeno, y esto en muchos casos, es suficiente para mejorar crecimiento vegetal debido a un mayor aporte de nutrientes. En este ensayo en concreto, en ninguna de las condiciones existieron diferencias significativas en cuanto a la biomasa de la raíz y parte aérea entre la inoculación sólo con MA11 y C-. Esto se trata de otro indicativo que apunta a ambas especies *Variovorax* como PGPB asociadas al nódulo. En cuanto a los resultados de experimento en maceta, el peso seco de parte aérea y raíz (C), mostraron diferencias significativas inocularlas con CSV en comparación con C-, así como en la inocualación con MA11 por separado. Esto indica que el papel de las *Variovorax* como PGPB asociadas al nódulo es importante en el proceso de regeneración de suelos contaminados. Se muestran diferencias de biomasa área en macetas (D), plantas en ausencia de inoculación (1) y planta de la inoculación con CSV (2).

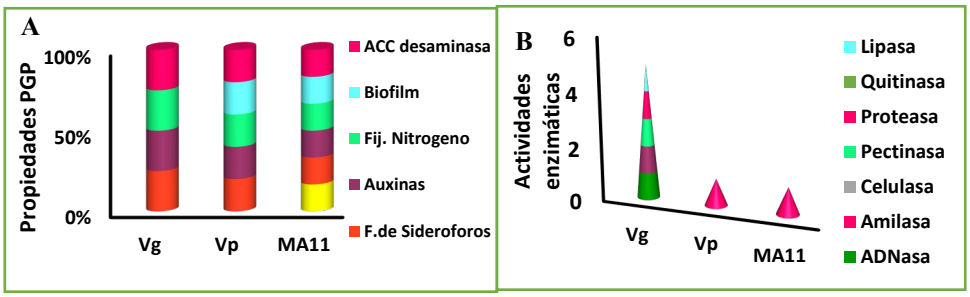


Figura 1. A.Propiedades PGP de bacterias aisladas. B. Actividades enzimáticas de bacterias utilizadas en este experimento.

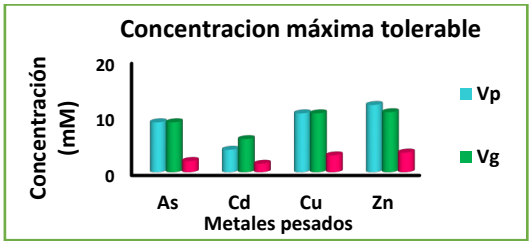


Figura 2. Concentraciones (mM) soportadas por ambas bacterias y el rizobio.

En la (Figura 5 E) se muestra la representación del aspecto de las plantas una vez finalizado el experimento, control sin inocular (1), inoculación con MA11(2) y la inoculación con CSV (3). Se observan claramente las diferencias entre los tres tratamientos tanto en raíz como en parte aérea, gracias a las propiedades PGP, actividades enzimáticas y la capacidad de tolerar metales que poseen estas

bacterias. Para este experimento se utilizó muestras de suelos contaminados con metales pesados procedentes de las Marismas del Rio Odiel. Se comprobó la localización *V. gossypii* mediante el marcaje del nódulo con fluorescencia (Datos no mostrados). El nódulo es un ambiente con baja concentración de oxígeno, ya que, contiene una peculiar corteza que hace de barrera de resistencia a la difusión de oxígeno, al crecer mejor en agar, crece mejor en condiciones limitantes de oxígeno (González-Sama *et al.,* 2006).

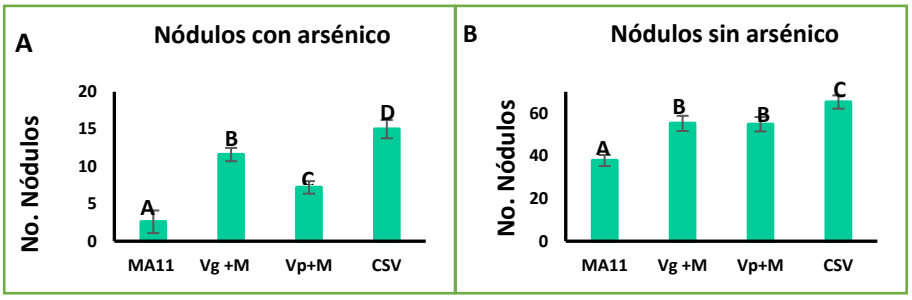


Figura 3. Número de nódulos totales por tratamiento *in vitro*. En presencia de arsénico (A). En ausencia de arsénico (B). Letras diferentes indican diferencias significativas. Duración del experimento:30 días. ($p < 0,05$).

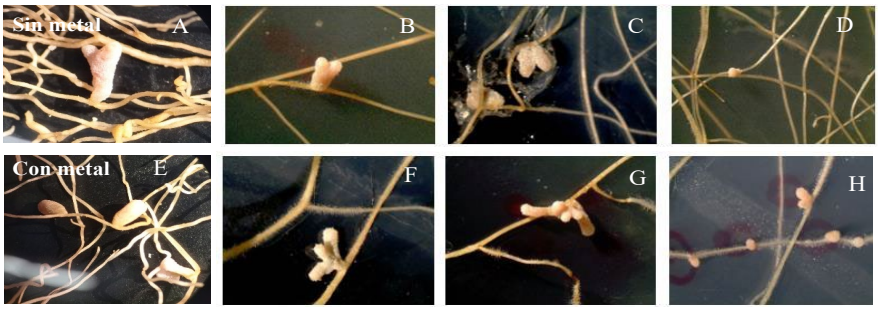


Figura 4: Imágenes de nódulos de las plantas inoculadas el consorcio CSV (A, E), con MA11+VP (B, F), MA11+VG (C, G), MA11 (D, H). Imágenes superiores condición sin arsénico. Imágenes inferiores, en condición con arsénico. Misma escala.

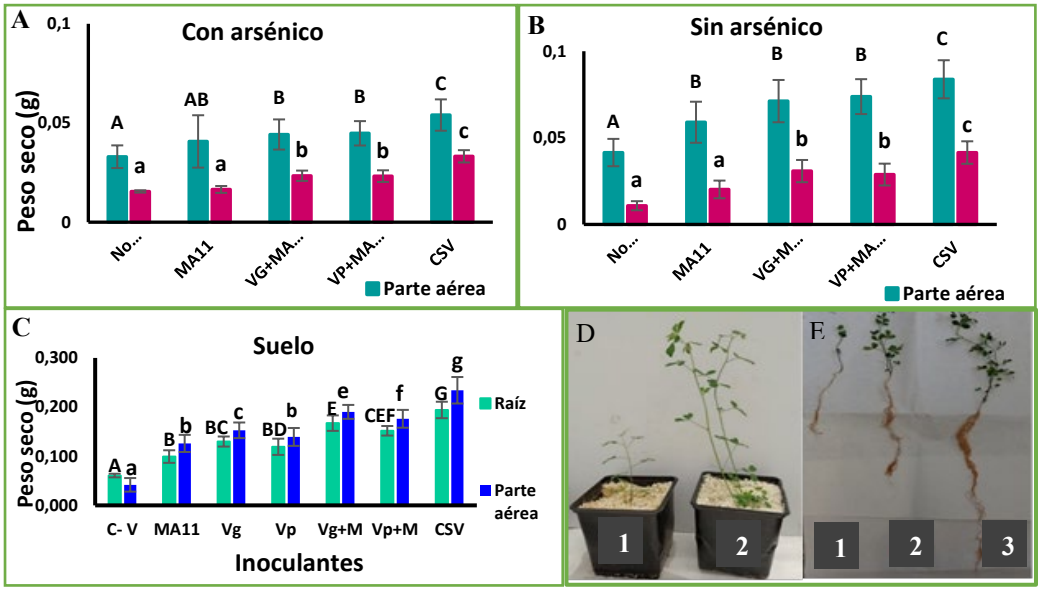


Figura 5. Peso seco por planta experimento *in vitro*. En presencia de arsénico (A), en ausencia de arsénico (B). Peso seco por planta en maceta (C). ($P < 0,05$) C-: no inoculado, MA11: inoculada con *E. medicae* MA11, MA11+VG: inoculado con *V. gossypii y* MA11+VP: inoculado con *V. paradoxus* y CSV: inoculado con el consorcio. Biomasa área en macetas (D), planta sin inocular (1), planta inoculada con el consorcio CSV (2). Aspecto de las plantas (E), planta no inoculada (1) inoculada con MA11 (2) inoculada con el consorcio CSV (3).

Conclusiones

Las especies de *Variovorax* tienen un gran número actividades promotoras del crecimiento, actividades enzimáticas, son multirresistentes a metales pesados, lo que indica que puedan ser usadas como co-inoculantes en estuarios contaminados con metales pesados y a su vez, ayudar a la biorremediación de suelos degradados.

La inoculación con el consorcio (CSV) de las dos bacterias no rizobio (Vg y Vp) junto al rizobio *E. medicae* mejoran la nodulación, ya que el número de nódulos es significativamente mayor, esto puede estar relacionado con la reducción del estrés por la presencia de la actividad ACC desaminasa o la mayor actividad nitrogenasa, indicando que ambas bacterias pueden considerarse PGPE asociadas al nódulo (NAB).

Agradecimientos

Proyecto **Feder US-1262036**. FEDER Andalucía 2014-2020, de la Consejería de Economía, Conocimiento, Empresa y Universidad de la Junta de Andalucía.

Bibliografía

Andrades-Moreno, L., Delcastillo, I., Parra, R., Doukkali,B, Redondo-Gómez, S., Pérez-Palacios, P., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., and Rodríguez-Llorente, I.D. 2014. Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21: 3713–3721. https://doi.org/10.1007/s11356-013-2364-8

Bessadok K, Navarro-Torre S, Eloísa Pajuelo, Rodríguez-Llorente I et al. 2020. The ACC-deaminase producing *bacterium Variovorax* sp. CT7.15 as a Tool for Improving *Calicotome villosa* nodulation and growth in arid regions of Tunisia. Microorganism. 8:541-557. https://doi.org/10.3390/microorganisms8040541

Burd, G., Dixon, D.G., Glick, B., 2000. Plant growth-promoting bacteria that decreases heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol. 46: 237–245. https://doi.org/10.1139/w99-143

Chen, L. et al. 2013. The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth y development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway', J Exp Bot. 64:1565–1573. https://doi.org/10.1093/jxb/ert031

Das, N., Basak, L.V.G., Salam, J.A., Abigail, E.A. 2012. Application of biofilms on remediation of pollutants- an overview. J. Microbiol. Biotech. Res. 2: 783-790.

Dutta, J. y Thakur, D. 2017. Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential y phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India, PLoS ONE. 12:1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182302

Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., Chen, S. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing *bacilli* from plant rhizospheres in Beijing region. J Appl Microbiol. 99: 1271-81. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02738.

Esquiel-Cote, R., Gavilanes, R.M., Cruz, O.R., and Huante, P. 2013. Agrobiotechnological importance of the ACC deaminase in Rhizobacteria a review. Rev. fototec, Mex. 36: 251-258

Elbeltagy A., Nishioka K., Suzuki H., Sato T., Sato Y.I., Morisaki H., Mitsui H., Minamisawa K. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteri from wild and traditionally cultivated rice varieties. Soil Sci Plant Nutr. 46, 617–629. https://doi.org/10.1080/00380768.2000.10409127

Franche C, Lindström K y Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil. 321:35-59. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8

González-Sama et al. 2006. Características especiales de la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) C.S.I.C. 182-193.

Gordon, S.A., Weber, R.P., 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant Physiol. 26:192–195. https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192

Herrera Marcano, T. 2011. La contaminación con cadmio. En suelos agrícolas, Venesuelos. 8:42–47.

Joshi, S., Singh, A. V. y Prasad, B. 2018. Enzymatic activity y plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera'*, Int J Curr Microbiol Appl Sci, 7:2314–2326. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.277

Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M. et al. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nat. 286, 885–886. https://doi.org/10.1038/286885a0

McCully M, 2005. The rhizosphere: the key functional unit in plant/soil/microbial interactions in the field. Implications for the understying of allelopathic effects. In Allel Soc. 21-26

Mesa, J., Mateos-Naranjo, E., Caviedes,M.A, Redondo-Gómez,S., Pajuelo,E., and Rodríguez-Llorente, I.D. 2015a. Scouting contaminated estuaries: heavy metal resistant and plant growth promoting rhizobacteria in the native metal rhizo accumulator *Spartina maritima*. Mar Pollut Bull. 90:150–159. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.002

Mesa, J., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M.A., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., and Rodríguez-Llorente, I.D. 2015b. Endophytic cultivable bacteria of the metal bioaccumulator *Spartina maritima* improve plant growth but not metal uptake in polluted marshes soils. Front Microbiol. 6:1450. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01450

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170:265–270. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x

Navarro-Torre, S.E., Mateos-Naranjo, M.A., Caviedes, Pajuelo, E., and Rodríguez-Llorente, I.D. 2016. Isolation of plant-growth-promoting and metal-resistant cultivable bacteria from *Arthrocnemum macrostachyum* in the Odiel marshes with potential use in phytoremediation. Mar Pollut Bull.110: 133–142. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.070.

Navarro-Torre S, Bessadok K, Flores-Duarte N.J, Rodríguez-Llorente I.D, Caviedes M.A, Pajuelo E. 2020. Helping legumes under stress situations: inoculation with beneficial microorganisms. In: Hasanuzzaman M, editor. Legume crops. IntechOpen. 1–10.

Neumann, H. et al. 1998. Toxicity testing of heavy metals with the rhizobium-legume symbiosis: high sensitivity to cadmium y arsenic compounds, Environ Sci Pollut Res Int. 5:8–36. https://doi.org/10.1007/BF02986371

Nieto, J.M., Sarmiento, A.M., Olias, M., Delvalls, A. 2007. Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva estuary. Environ Int. 33: 445-455. https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.010.

Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Caviedes MA. 2020. Effect of arsenic on legumes: analysis in the model *Medicago truncatula-Ensifer* interaction. In "The Model Legume *Medicago truncatula*. Jonh Wiley & Sons, Inc. Pub., ch. 5. 2:268-280. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00915-9

Penrose, D.M., Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting Rhizobacteria. Physiol Plant. 118: 10–15. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.

Prescott H. 2002. Laboratory exercises in microbiology. McGraw-Hill. 466.

Richardson AE y Simpson RJ. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. Plant Physiol. 156:989-996. https://doi.org/10.1104/pp.111.175448

Schwyn, B., Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Ann. Biochem.160:47–56. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell, Oxford. https://doi.org/10.1002/jobm.19720120524

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

"Aplicaciones precosecha con poliaminas reducen fisiopatías e incrementan la calidad de cereza de la IGP montaña de Alicante"

M. Nicolás, C. Ruiz-Aracil, A. Carrión-Antolí, J.M. Lorente-Mento, J.M. Valverde, F. Guillén

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental CIAGRO. Grupo de Investigación en Post-recolección de Frutas y Hortalizas. Universidad Miguel Hernández, carretera de Beniel km 3.2 Orihuela, Alicante. E-mail: marta.nicolas@alu.umh.es

Resumen

Las cerezas son frutas muy con una corta vida útil y además son muy sensibles al agrietado en precosecha. Pese a que son distintos los factores que pueden incidir en el agrietado del fruto, la aparición de lluvias en estados avanzados de madurez del fruto compromete la integridad de la cereza debido a la aparición del agrietado por estos fenómenos ambientales. Las cerezas de la IGP "cerezas de la montaña de Alicante" son frutos muy expuestos a importante pluviosidad dada la orografía del terreno, ocasionando importantes pérdidas económicas. En este trabajo se ha estudiado el efecto de tratamientos de precosecha con productos naturales sobre la cereza (*Prunus avium* L. 'Sweet Heart') aplicados desde la floración hasta el momento de la cosecha. Los árboles fueron rociados foliarmente con poliaminas, aplicadas en tres etapas del ciclo de desarrollo del fruto (floración, endurecimiento del hueso y cambios de color). Estos tratamientos mostraron una menor incidencia del rajado de los frutos, así como una mejora en la calidad de las cerezas en postcosecha. De hecho, los tratamientos fueron capaces de retrasar la evolución de distintos parámetros de calidad como fueron la pérdida de peso y la firmeza de los frutos, mientras que incrementó los niveles de acidez total y azúcares y con ello aumentando la aceptabilidad del consumidor. Los parámetros de color a * / b * fueron superiores en los frutos tratados con poliaminas con respecto a las cerezas controles. Por lo tanto, los tratamientos precosecha con compuestos naturales pueden aumentar de manera eficiente y natural los parámetros de calidad de la cereza en la cosecha y durante su posterior almacenamiento postcosecha.

Palabras clave: Maduración, color, almacenamiento, recolección, agrietado, precosecha

"Pre-harvest treatments with poliamines reduce pathophysiology and increase sweet cherry quality from IGP Montaña de Alicante

Abstract

Sweet cherries are very perishable fruits and are also very sensitive to pre-harvest cracking. Although factors that can affect fruit cracking are different, when rain appears at advanced ripening stages can be affected sweet cherry integrity due to the appearance of cracking because these environmental phenomena. Sweet cherries obtained from IGP Montaña de Alicante are fruit that are highly exposed to significant rainfall due to the orography, causing significant economic losses. In this study, the effect of pre-harvest treatments with natural compounds on sweet cherry (*Prunus avium* L. 'Sweet Heart') applied from flowering to harvest time has been studied. Trees were foliar sprayed with different polyamines concentration, applied in three different development stages (flowering, pit hardening and color changes). These treatments showed a lower cracking incidence, as well as an improvement in the sweet cherry quality. In fact, polyamine treatments were able to delay the evolution of different quality parameters such as weight loss and fruit firmness, while increasing total acidity and sugar levels, thereby increasing consumer acceptability. The a */ b * color parameters were higher in fruit treated with polyamines compared to the control ones. Therefore, pre-harvest treatments with natural

compounds can efficiently and naturally increase sweet cherry quality parameters at harvest and during its subsequent post-harvest storage.

Keywords: Shelf life, polyphenols, refrigeration, commercialization, metabolism

Introducción

Las cerezas son frutos con un periodo de comercialización muy reducido. Son frutas con una gran aceptación por parte de los consumidores debido a su excelente calidad organoléptica, nutritiva y a su alto contenido de compuestos bioactivos (Serrano et al., 2005 cereza). Las cerezas procedentes de la IGP Montaña de Alicante, tienen unas características determinadas por el mayor número de precipitaciones recibidas, la composición del suelo y la orografía del terreno.

Estas características agroclimáticas provocan precocidad en el fruto, dando lugar a una cereza de alta calidad. Sin embargo, el mayor número de precipitaciones puede afectar al rajado de las cerezas especialmente si estas se producen en estadios del fruto cercanos a la cosecha. Este hecho incrementa la vulnerabilidad del cerezo cultivado en la montaña de Alicante pese a la calidad de las cerezas dando lugar a pérdidas económicas cada año ya que estos fenómenos abióticos comprometen tanto la floración de los cerezos como la integridad de los frutos (Guillén y Serradilla, 2021). La presencia de cracking o agrietado de las cerezas, está influenciada por el genotipo, condiciones de cultivo, patrón, tamaño, potencial osmótico de la pulpa, características de la cutícula y estado de maduración, así como por la duración y distribución de las lluvias, temperatura y concentración mineral del agua de lluvia (Michailidis et al., 2020; Pereira et al., 2020). Sin embargo, no se conocen bien los factores fisiológicos, bioquímicos, ambientales, culturales, anatómicos y genéticos, incluyendo las estrategias de gestión para mitigar el agrietamiento de las cerezas inducido por la lluvia.

Observaciones experimentales indican que las poliaminas son necesarias para la vida vegetal. Plantas mutantes que presentan deficiencia en la biosíntesis de poliaminas crecen deficientemente e incluso pueden llegar a morir. La aplicación de poliaminas en estas plantas mutantes puede restaurar el crecimiento normal. Por otra parte, niveles muy elevados de poliaminas pueden provocar toxicidad e incluso apoptosis (Galston et al., 1997; Alcázar et al., 2010).

La aplicación precosecha de hormonas vegetales propias de las plantas como son las poliaminas es capaz de afectar a multitud de procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas; dichos procesos son tan diversos como la iniciación de procesos de organogénesis o la protección contra ciertos tipos de estrés (Tiburcio y Figueras-Remolat, 1992). En este estudio evaluamos las posibilidades precosecha de las aplicaciones con putrescina a la hora de hacer frente al agrietado de los frutos durante el desarrollo en el árbol, además de los posibles efectos beneficiosos durante el posterior almacenamiento poscosecha en cerezas cv. Sweet Heart.

Materiales y Métodos

Este estudio se ha realizado en la finca experimental de la IGP “Cerezas de la montaña de Alicante” situada en Patró (Alicante). Mediante pulverización foliar se aplicaron dos distintas concentraciones de putrescina (1 y 10 mM) en cerezas *Prunus avium* L. de la variedad Sweet Heart (SH). Las aplicaciones foliares (3 L/árbol), se realizaron en 10 árboles por cada tratamiento y otros diez árboles se trataron con agua destilada (control). Los tratamientos se realizaron en cuatro momentos clave del desarrollo de la cereza: botón floral, plena floración, endurecimiento del hueso y cambios de color.

El agrietado de los frutos durante el periodo precosecha se evaluó mediante el conteo en el árbol de 50 frutos por árbol (n=500), localizados alrededor del perímetro de los árboles. Además, en el momento de la cosecha se evaluó el índice de agrietamiento a través de inmersiones en agua de 150 frutos sin agrietar de cada uno de los tres distintos lotes de árboles, siguiendo la metodología descrita detalladamente por Lorente-Mento et al., (2020). Además, el día de la recolección de las cerezas con madurez comercial, se llevaron al laboratorio y se seleccionaron las cerezas con tamaño y color homogéneo, descartándose los frutos con daños o fisiopatías. Todos los frutos se almacenaron a 2 °C y fueron evaluados tras 21 días de almacenamiento con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos precosecha sobre la vida útil en condiciones de refrigeración. En el estudio postcosecha, 3 muestras de 10 cerezas por lote y día de muestreo fueron sometidas a las siguientes determinaciones descritas con detalle por Serrano et al., (2009): la respiración se determinó mediante sistema estático por triplicado (n=6); el peso, color y la firmeza del fruto se determinaron individualmente en cada cereza (n=30). Los sólidos solubles y la acidez titulable fueron evaluados en tres muestras de cada lote por duplicado (n=6) y de la relación entre estos dos parámetros se obtuvo el índice de madurez. Finalmente se evaluó el pardeamiento del pedicelo de forma visual estableciendo una escala de 0 a 4 puntos donde 0 = sin daños, 1 = 25 % del pedicelo afectado, 2 = 50 % del pedicelo pardeado, 3 = 75% del pedicelo pardeado y 4 = pardeamiento completo del pedicelo. En este estudio se ha utilizado un diseño completamente aleatorio. Las diferencias entre los distintos tratamientos se han estudiado mediante análisis de la varianza. Cuando las diferencias mostradas por las distintas muestras han resultado ser significativas, las medias se han separado mediante la prueba de Tukey. Todos los análisis se han realizado con el Software SPSS v. 20.0.

Resultados y Discusión

Tras evaluar los resultados obtenidos tras el almacenamiento en condiciones de refrigeración sub-óptima, pudimos comprobar que los tratamientos con putrescina en precosecha fueron capaces de reducir la respiración.

Cuando se estudió el porcentaje de frutos afectado por el agrietado en precosecha, pudimos comprobar como el tratamiento con putrescina fue efectivo a la hora de reducir el agrietado en el árbol. Sin embargo, sólo la dosis más baja aplicada (1 mM) fue capaz de reducir esta fisiopatía de forma significativa ($p < 0.05$). De forma análoga cuando en la recolección se sometió a cerezas sanas a inmersiones para inducir el rajado, pudimos comprobar como los tratamientos aplicados fueron exitosos a la hora de reducir el rajado inducido. Aunque no existen estudios previos que relacionen las aplicaciones precosecha con poliaminas con un menor rajado de las cerezas en la cosecha, sí se han estudiado las aplicaciones postcosecha con putrescina y otras poliaminas, constatando la mayor integridad de las membranas celulares, así como la reducción en la concentración de las especies reactivas de oxígeno dando lugar a una mayor resistencia frente a distintos tipos de estrés (Tiburcio y Figueras-Remolat, 1992; Serrano et al., 2016).

Durante el estudio postcosecha de las cerezas recolectadas de los distintos árboles tratados y controles, pudimos comprobar como los tratamientos fueron positivos a la hora de retrasar las pérdidas de peso durante el almacenamiento refrigerado. De hecho, encontramos diferencias entre los tratamientos con putrescina y las cerezas controles mostrando estos últimos valores significativamente ($P < 0.05$). mayores durante el estudio realizado. La reducción en las pérdidas de peso, podría ser debido a una mayor integridad de las membranas estructurales de las células que reducirían las pérdidas de agua (Valero et al., 2002; Bal y Ürün, 2021). Además, la respiración celular también se vio afectada por los tratamientos precosecha durante el almacenamiento postcosecha, reduciéndose significativamente ($P < 0.05$) con respecto a la que mostraron los frutos control. Este hecho podría estar afectando a la

reducción de las pérdidas de peso. De hecho, en investigaciones anteriores se ha constatado la acción de la putrescina sobre la respiración mediante la transformación de la putrescina en ácido gamma-aminobutírico (GABA). De esta forma, las células reciben un aporte inmediato de GABA que utiliza como sustrato energético adicional aumentando el balance energético neto en las células vegetales y cubriendo las necesidades energéticas adicionales requeridas por el fruto (Nikmaran et al., 2017) provocadas por la senescencia.

Tabla 1. Efecto de los distintos tratamientos precosecha sobre el agrietado de los frutos y sobre las características de las cerezas en la cosecha y tras un almacenamiento de 21 días a 2°C.

Parámetro	Evaluación en el momento de la cosecha		
	Control	Putrescina 1 mM	Putrescina 10 mM
Agrietado en el árbol (%)	6,60 ± 1,43a	2,50 ± 0,25b	5,76 ± 1,11a
Índice de agrietado	23,80 ± 0,60a	6,20 ± 1,05c	10,40 ± 0,40b

Parámetro		Control	Putrescina 1 mM	Putrescina 10 mM
Pérdida de peso (%)	Día 0	-	-	-
	Día 21	9,96 ± 0,33a	7,92 ± 0,30b	8,45 ± 0,33b
Tasa de Respiración (mg $CO2\ kg^{-1}\ h^{-1}$)	Día 0	31,93 ± 2,96a	26,75 ± 1,41b	27,65 ± 0,30ab
	21 d 2 ºC	23,16 ± 0,55a	19,83 ± 0,86b	19,60 ± 0,49b
Ángulo Hue*	Día 0	17,57 ±0,58a	13,63 ± 0,91b	14,76 ± 0,77b
	21 d 2 ºC	13,68 ± 0,45a	11,34 ± 0,51b	12,87 ± 0,47a
Firmeza ($N\ mm^{-1}$)	Día 0	2,08 ± 0,10a	2,09 ± 0,10a	2,16 ± 0,06a
	21 d 2 ºC	1,54 ± 0,06b	1,77 ± 0,09a	1,49 ± 0,05b
Sólidos solubles (%)	Día 0	22,42 ± 0,07b	24,42 ± 0,02a	21,80 ± 0,23c
	21 d 2 ºC	24,77 ± 0,02b	26,35 ± 0,14a	23,80 ± 0,01c
Acidez (%)	Día 0	1,22 ± 0,01b	1,36 ± 0,01a	1,22± 0,01b
	21 d 2 ºC	1,09 ± 0,03b	1,14 ± 0,01a	1,14 ± 0,01a
Índice de Madurez	Día 0	18,30 ± 0,21a	17,88 ± 0,23b	17,85 ± 0,21b
	21 d 2 ºC	22,62 ± 0,63a	22,97 ± 0,31a	20,78 ± 0,23b
Pardeamiendo pedicelo (escala 0-4)	Día 0	-	-	-
	21 d 2 ºC	3,06 ± 0,06a	2,93 ± 0,08a	3,10 ± 0,13a

Los datos han sido expresados como la media ±SE. Para cada parámetro diferentes letras dentro de la misma fila muestran diferencias significativas p<0,05.

La expresión del color como una relación matemática de varios parámetros individuales de color ofrece una idea más objetiva de la evolución de este parámetro. Por ello mostramos la evolución del color expresado como ángulo Hue*, que nos indica la tonalidad más o menos intensa del color rojo del

fruto. Durante el almacenamiento postcosecha el ángulo Hue* desciende significativamente especialmente para aquellas cerezas tratadas en precosecha con la menor de las dosis de putrescina. Este descenso en el ángulo Hue* está relacionado con la síntesis de pigmentos de color rojo característicos de la cereza, y con el posterior oscurecimiento del fruto (Serrano et al., 2009).

Con respecto a la firmeza de los frutos durante el almacenamiento postcosecha, pudimos observar un efecto significativo ($p< 0.05$) en el mantenimiento de este parámetro en los frutos que se trataron en precosecha con la más baja de las dosis (1 mM). Este efecto se ha demostrado en distintas especies vegetales estudiadas por nuestro grupo de investigación (Martínez-Romero et al., 2000; Serrano et al., 2016). La acción anti-senescente de las poliaminas, concretamente mediante su habilidad de unirse a las paredes celulares incrementando su estabilidad podría ser una de las causas por las que las poliaminas mantienen este parámetro bien tras su aplicación precosecha como en el estudio aquí presentado como tras aplicaciones postcosecha (Martínez-Romero et al., 2000; Valero et al., 2002).

La dosis más baja de putrescina aplicada en el árbol incrementó los niveles de azúcares y de acidez total en los frutos durante su posterior almacenamiento con diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al resto de tratamientos cuyos niveles fueron menores de ambos parámetros. El mayor contenido en acidez de los frutos tratados en el árbol pone de manifiesto el efecto en el retraso de la maduración de estos compuestos. Este retraso estaría relacionado con el menor metabolismo observado anteriormente con la reducción de la respiración como se ha observado en otros frutos como el albaricoque (Davarynejad et al., 2013). De hecho, cuando estudiamos el índice de madurez observamos como los tratamientos con putrescina fueron capaces de retrasar significativamente la evolución de este parámetro debido a la relación entre el contenido en sólidos solubles y la acidez total. Frutos con un adecuado nivel de azúcares, con mayor acidez y con ausencia de defectos, darían lugar a una mayor aceptación por parte de los consumidores (Silva et al., 2021) aunque los tratamientos no mostraron diferencias significativas con respecto a la calidad del pedicelo.

Conclusiones

Tras estudiar de forma conjunta los parámetros evaluados en este estudio, podemos concluir que los tratamientos precosecha con putrescina, podrían ser una alternativa de origen natural, capaz de mejorar la resistencia al rajado de los frutos, y de retrasar la senescencia, mejorando su vida útil y la calidad general de la cereza.

Bibliografía

Bal, E., Ürün, B.A. 2021. Effects of Chitosan Coating with Putrescine on Bioactive Compounds and Quality of Strawberry cv. San Andreas During Cold Storage. Erwerbs-Obstbau, 63, 7-14. http://dx.doi.org/10.1007/s10341-020-00531-9

Davarynejad, G., Zarei, M., Ardakani, E., Nasrabadi, M.E. (2013) Influence of Putrescine application on storability, postharvest quality and antioxidant activity of two Iranian apricots (Prunus armeniaca L.) cultivars. Not Sci Biol 5:212–219. https://doi.org/10.15835/nsb.5.2.9041

Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., Burgos, L., Riquelme, F. 2000. Exogenous polyamines and gibberellic acid effects on peach (Prunus persica L.) storability improvement J. of Food Sci. 65(2); 288-294. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15995.x

Nikmaram, N., Dar, B. N., Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Greiner, R., Johnson, S. K. (2017). Recent advances in γ-aminobutyric acid (GABA) properties in pulses: An overview. J. Sci. Food Agric, 97, 2681–2689. https://doi.org/10.1002/jsfa.8283

Serrano, M., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D. 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. J Agric Food Chem. 22;57(8):3240-6. https://doi.org/10.1021/jf803949k

Serrano, M., Zapata, P.J., Martínez-Romero, D., Díaz-Mula, H, Valero, D. 2016. Polyamines as an eco-friendly postharvest tool to maintain fruit quality. In: Siddiqui MW (ed) Ecofriendly technologies postharvest produce quality. Elsevier Inc., London, UK. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804313-4.00007-4

Silva, V.; Pereira, S.; Vilela, A.; Bacelar, E.; Guedes, F.; Ribeiro, C.; Silva, A.P.; Gonçalves, B. Preliminary Insights in Sensory Profile of Sweet Cherries. Foods 2021, 10, 612. https://doi.org/10.3390/foods10030612

Tiburcio A.F. y Figueras Remolat, X. 1992. Rutas metabólicas de las poliaminas en las plantas. Boletín Sociedad Española de Fisiología Vegetal 17: 3-8.

Valero D, Martínez-Romero D, Serrano M (2002) The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. Trends Food Sci Technol 13:228–234 https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00134-6

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Climate change, Food crisis, Covid.19 in Mozambique

J. Etsong

Centre for Social Studies, University of Coimbra, Colégio de S. Jerónimo. Apartado 3087. 3000-995 Coimbra, Portugal. E-mail: etsongmbang@ces.uc.pt

Abstract

Mozambique is one of the countries most exposed to climate change. Temperatures in this region are in fact increasing twice as fast as the world average. This explains the resurgence in recent years of tropical storms and other cyclones. These cyclonic episodes alternate with severe droughts that plunge millions of people into food insecurity as more than half of the region's population lives on subsistence agriculture. The rapidity of the Sars-Cov-2 epidemic necessitated the taking of measures aimed at containing the epidemic - in particular quarantines and restrictions on public gatherings and the movement of goods and people - which disrupted the chains of supply to the agricultural market, and many farmers will not have been able to grow or sell their commodities due to lack of inputs and labor. However, with the disruption of the food supply, there is a high risk that vulnerable populations will migrate to more favorable areas in search of better living conditions. In a country like Mozambique, the conjunction of climatic, food and health factors can bring to a standstill the fragile social balance already undermined by precarious living conditions, corruption and ever increasing social vulnerability. The country being located on the intertropical belt and concerned by the recrudescence of the announced disasters, the authorities would be well inspired to find a new speech, much more persuasive than the simple resilience. Develop strategies for mitigating and adapting to the new normal created by the combination of often feared factos. In the light of these elements, this work analyzes the food insecurity risk situation in the country and the probability of occurrence of worry disorders under the combined effect of extreme weather events and covid.19.

Keywords: Climate change, Covid-19, food crisis, food insecurity risk, social vunerabilit.

Resumen

Mozambique es uno de los países más expuestos al cambio climático. De hecho, las temperaturas en esta región están aumentando dos veces más rápido que la media mundial. Esto explica el resurgimiento en los últimos años de tormentas tropicales y otros ciclones. Estos episodios ciclónicos se alternan con graves sequías que sumen a millones de personas en la inseguridad alimentaria, ya que más de la mitad de la población de la región vive de la agricultura de subsistencia. La rapidez de la epidemia de Sars-Cov-2 hizo necesaria la adopción de medidas destinadas a contener la epidemia -en particular, cuarentenas y restricciones a las reuniones públicas y a la circulación de bienes y personas- que interrumpieron las cadenas de suministro al mercado agrícola, y muchos agricultores no han podido cultivar ni vender sus productos por falta de insumos y mano de obra. Además, con la interrupción del suministro de alimentos, existe un alto riesgo de que las poblaciones vulnerables emigren a zonas más favorables en busca de mejores condiciones de vida. En un país como Mozambique, la conjunción de factores climáticos, alimentarios y sanitarios puede paralizar el frágil equilibrio social ya minado por las precarias condiciones de vida, la corrupción y la creciente vulnerabilidad social. Dado que el país está situado en el cinturón intertropical y está preocupado por el aumento de las catástrofes previstas, las autoridades harían bien en encontrar un enfoque más persuasivo que la simple resiliencia. Como por ejemplo, desarrollar estrategias de mitigación y adaptación para la nueva normalidad que está creando la combinación de factores de riesgo Partiendo de estos elementos, este trabajo analiza la situación de riesgo de inseguridad alimentaria en el país y la probabilidad de ocurrencia de desórdenes preocupantes bajo el efecto combinado de eventos climáticos extremos y covid.19.

Palabras clave: Cambio climático, Covid-19, crisis alimentaria, riesgo de inseguridad alimentaria, vunerabilidad social.

Introduction

With almost 2,700 km of coastline along the Indian Ocean, Mozambique is a country now accustomed to tropical storms and cyclones. As factors of the resurgence of cyclonic episodes, the temperature of the waters of the Canal, which has risen considerably in recent years, allowing tropical storms and cyclones to gain more force and intensity thanks to strong evaporation and to hit hard on Mozambique. For about two decades, these cyclones or tropical storms have hit the country with certain regularity, destroying buildings, roads, public infrastructure and "*precarious neighborhoods on the outskirts*" (Intervention de Mgr Claudio Dalla Zuanna au Vatican sur les revages du changement climatique au Mozambique). But one of the most notable consequence is the complete destruction of agricultural fields by the floods which submerge arable land under water, constantly threatening the food security of vulnerable populations. In addition to almost regular cyclonic episodes, drought is far from being a new phenomenon. More frequent than floods and tropical storms, it affects a larger population, the vast majority of whom lives on subsistence agriculture. Today, the covid-19 health crisis is added to the particularly tense security context and recurring climate crises as if to demonstrate that the effects of climate change in this country are no longer a hypothesis. This case seems interesting to study in the sense that the combination of these factors can lead to certain risks of new hunger riots like the one already observed in the continent in 2008 and 2010 in Mozambique. Recall now that Africa has more than 250 million people in a situation of undernourishment, i.e about 32 percent of the undernourished people in the world, a prevalence that was at 19.1 percent and clearly showed that an African in five were exposed to chronic malnutrition problems (FAO, 2020). For the case of Mozambique alone, official figures indicate the country has over 4.5 million food insecure people and over 1.5 with malnutrition problems.

Mozambique, a country in a state of permanent natural disasters

Mozambique is subject to an upsurge in cyclone-type climatic events. The global climate risk index produced by Germanwatch reminds us of how much this country suffers from extreme events. Droughts, tropical storms, cyclones, floods are part of its annual lot of bad weather with an increasing intensity each time over the past two decades. Temperatures there are increasing twice as fast as the world average (Gerald Bourke, représentant du Programme alimentaire mondial (PAM)). This climate change favors the cyclonic episodes which have become frequent in recent years, to the point of making Mozambique the fifth country most affected by natural disasters between 2000 and 2019 and the territory which has suffered the most from these violent episodes in 2019 (Rapport du Germanwatch, 2021). Mozambique's vulnerability is therefore increasingly noticeable. Cyclones and tropical storms overlap with severe droughts that plunge populations into food insecurity. The best known are from 1991-1992 and that of 2016, the worst of all in 35 years. In the period 2000-2012, the country experienced more than 11 hurricanes, with in 2000 a combination of factors that caused catastrophic flooding in the Limpopo basin after the passage of Cyclone Eline causing about 800 deaths and nearly 4,5 million people affected. On March 14, 2019, Cyclone Idai Classified in category 4, hit the city of Beira and its surroundings with strong winds speeds between 180 and 220 km/h and heavy rains of 200mm in 24 hours, causing the rivers to exit their beds. It is estimated at 3000Km2 and more than 715000 hectares of cultivable land which has been submerged by water. While the country was still recovering from this trauma caused by the passage of Idai, it faced the umpteenth passage of a tropical cyclone called Éloise which hit the country on January 23, 2021, near the coastal city of Beira causing nearly 3,000 victims and 8,300 displaced according to a report by (INAM, 2019). Before this storm, another, Charlane had also hit in the same town of Beira. The country's scarce resources (Ranked 181st in the ranking of countries according to the UNDP Human Development Index) and the rapid succession of different disasters push the poor and impoverished populations a little further into

precariousness. These deadly catastrophes which last until April of each year do not leave Mozambique the time necessary to recover from the preceding ones.

The effects of recurrent disasters on food security and their social implications

The geography of Mozambique is characterized by three agroclimatic zones which determine the patterns of agricultural production. These agroecological zones are made up of arid and semi-arid lands that extend into the south and southwest of the country, the sub-humid areas in the center and north, and the wet highlands that lie mainly in the central provinces. Areas with strong agroecological potential are mainly found in the northern and central provinces of the country. The south is characterized by poor soils, scarcity of rainfall or repeated droughts and endless floods when the rains decide to fall. As production depends on atmospheric rainfall, its variability influences the yield performance of different crops. The great sowing season begins in December in the northern part and in September in the south. There is also an intermediate season which runs from March to July and results from residual soil moisture contributing to 10 percent of the country's production. However, in the southern region of the country made up of Gaza City, Inhambane, Maputo, Matola and Nampula, the sowing period is often marked by recurrent drought, the most striking of which are undoubtedly that of 1991-1992, that of 2016 and lately that of 2019 which in the opinion of specialists was the worst of the last thirty years. Its severity brought down the dams whose reserve levels fell by 30 percent, a situation which mainly affected agriculture. According to available statistics the 2016 episode killed over two hundred thousand head of oxen in the village of Pfukwe alone and affected over 4000 people. In the northern part and the center, the harvest period coincided with the hurricane season in the Mozambique Channel. In 2019 the floods in the province of Sofala erased the city of Beira and affected the fertile plains of the country and a few weeks later, Kenneth struck the north of the country, another agricultural area and important cereal pool of the country. These repetitions of macabre scenarios worsened the impact of the problems on agriculture and hence on the livelihoods and the food and nutritional security situation of the populations. The passage of the last cyclone which occurred near the harvest resulted in the loss of almost all agricultural production for the year 2019-2020 as well as those of grain reserves and herds of animals due mainly to flooding. A situation which has contributed to a reduction in the food ration in many families, although the affected regions are considered the breadbasket of the country. They suffered severe food insecurity and other ailments. According to a progress report commissioned by the Mozambican Institute for Disaster Management and international organizations, until April 14, 2019, 1,100,000 people had received food aid and 907,000 people had received drinking water and 29,000 of them received assistance with food stuff, 10,500 received consultations to diagnose malnutrition and 1,400 people were saved. To this must be added the catastrophic effects of the cyclone, such as the lack of harvests, the scarcity of food and the increase in prices.

The agricultural sector in Mozambique according to official data employs about 80% of the labor force of the Mozambican population and represents 31.1% of the GDP. This workforce is for the most part female, for the cultivation of everyday consumer products as for cash products. With the passage of the cyclones, it diminished due to internal displacement, the re-emergence of certain diseases to which they were already vulnerable, the destruction of fields and markets and their confinement to domestic tasks. A situation which has also increased food insecurity. An assessment conducted by the World Bank estimates losses in the agricultural sector between US $ 141 and US $ 258, and 715,278 hectares of agricultural land that have been affected. The FAO report mentions a loss of more than 87 percent of production in some areas. The month of April generally coinciding with the second period of sowing which must be harvested in July, that of 2019 turned out to be disastrous with a problem of availability of seeds, but also of distribution and limited access to land agriculture due to flooding, with the consequences we know. Some infrastructures or fishing equipment have been destroyed, also affecting the activity and resources of those who exercise this activity as well as the loss of herds of

animals, other sources of protein and earnings for the breeders. Unfortunately, it is feared that the food situation in Mozambique will bring back the Specter of the hunger riots of 2008 and 2010 which shook the country and the continent.

Covid-19 and food security: What are the risks for Mozambique

On July 1, 2020, the State Food Security Secretariat officially recognized that 365,000 people were food insecure in the city of Maputo and that the situation could very quickly spread to other regions of Mozambique given the persistent drought and rainfall conditions (Made for minds, 2020). The measures taken to limit the spread of the Sarcov2 virus are singled out as aggravating factor of this food insecurity. The level of this food insecurity is classified at level 2 of the IPC index, a less severe situation, but worrying insofar as families, due to the confinement measures, have lost their usual income to live only on alternative work, on the sly trade or family solidarity.

The occurrence of the first case of Covid19 in Mozambique in March 2020, just 11 months after Cyclones Idai and Kenneth struck the country in turmoil following the containment measures that were subsequently decreed there. Unfortunately, Mozambique Ranked 181st country on the human development index risks seeing the combined effects of the covid-19 crisis, food crisis and the security crisis which has already put the cities of Cabo Delgado and Pemba in a situation of serious humanitarian crisis. The crisis affects demand for various reasons such as the uncertainty of tomorrow and the reduction in purchasing power as well as the supply itself as lives are threatened and the restriction of the mobility of people affects the increase in trade costs.

In addition, “border closures, lockdowns, and disruptions in markets, value chains and trade will help reduce people's access to diverse and nutritious food, especially in the hardest hit countries by the virus or already having a high level of food insecurity”.

For the FAO, we will have to face an imminent food crisis, unless action is taken quickly to protect the most vulnerable which include small farmers and small traders whose containment measures in Mozambique have drastically reduced access to the giving and receiving site, The Market. It is therefore necessary to maintain the activity of the sectors to mitigate the effects of the pandemic on the entire food system.

The examples of the management of the Ebola virus epidemic in Sierra Leone must be models not to be repeated. “Their sufferings were compounded by restrictions on movement that have prevented farmers from bringing their products to markets. The systemic effect was comparable to that of an earthquake, which shows that prevention and risk reduction strategies are now a priority”.

The hunger riots of 2008 also showed us that falling incomes and rising prices for basic necessities, coupled with chronic uncertainty, could lead people to strong protests. Just what to avoid in a country like Mozambique where the combination of climatic, health, and social crises could turn out to be an explosive mixture

Conclusions

The occurrence of cyclone episodes in a country like Mozambique is undoubtedly something inevitable, given the uniqueness of the geography of the country. However, the onset of the health crisis as a prelude to all zoonoses is now a risk that must be integrated into existing ones to prevent the combination of the latter from overtaking those in power and quickly becoming unmanageable. The mimicry that characterized African policies at the beginning of the crisis showed both the unpreparedness of our economic systems, but also the failure to consider feedback from the health crises that have already affected the continent as was the case of Ebola. All containment has shown its

limits and accentuated the prevalence of food crises in countries like Mozambique. It also implies that policies to protect the most vulnerable must be in order.

References

Afun-Ogidan D. et al (2012). Getting ready for take off: Lessons for regional CAADP. (Briefing Note 38). European Centre for Development Policy Management (ECDPM)

Ahmed OUHNIN, Fatima Ezzahra MENGOUB, La sécurité alimentaire en Afrique : une situation délicate et un avenir incertain à cause de la pandémie Covid-19 Rapport annuel sur l'économie de l'afrique. Pp 75.85, 2020

Banque Mondiale. (2020). Africa's Pulse: Une Analyse Des Enjeux Façonnant L'Avenir économique De l'Afrique. Washington, DC: Banque Mondiale. Bureau de l'économiste en chef de la région Afrique.

Covic, N., & Hendriks, S. L. (2016). achieving a Nutrition Revolution for Africa: The Road to Healthier Diets and Optimal Nutrition. ReSAKSS Annual Trends and Outlook Report 2015. International Food Policy Research Institute (IFPRI).

Étude de cas de la Federation internationale des sociétés de la croix rouge et du croissant rouge. Mozambique : le système d' alerte précoce aux cyclones dans la pratique

FAO. (2017). Vue d'ensemble régionale de la sécurité alimentaire et la nutrition. Le lien entre les conflits et la sécurité alimentaire et la nutrition : renforcer la résilience pour la sécurité alimentaire, la nutrition et la paix. . 2017: Food And Agriculture Orgnaization. FAO. (2020). COVID-19: Channels of transmission to food and agriculture. Rome: Food and Agriculture Organization.

FAO. (2020). The State Of Food Security And Nutrition In the World. Food and Agriculture Organization. • IFPRI. (2016). Global Nutrition Report 2016: From Promise to Impact: Ending Malnutrition by 2030. Washington, DC: International Food Policy

http://www.fao.org/africa/news/detail-news/en/c/1267974/Research Institute. COVID-19 : impact sur l'alimentation et l'agriculture

INGC. Instituto Nacional de Gestão das Calamidades Mozambique. AVALIAÇÃO RÁPIDA MULTISSECTORIAL PÓS-CICLONE IDAI 14 distritos das províncias de Sofala e Manica Moçambique 1-17 de abril de 2019

Intended Nationally Determined Contribution (INDC) of Mozambique to the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC

Thean Potgieter Covid-19: from global pandemic to disaster for the African continent / Covid-1 : de la pandémie mondiale au désastre pour le continent Africain / Covid-19: de pandemia global a desastre para o continente Africano. Published Online:1 Nov 2020

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Efecto de la aplicación de biofertilizantes basados en hongos micorrícicos y *Trichoderma harzianum* en el desarrollo de plantas de puerro

G. Díaz, V. Fernández y P. Torres

Departamento de Biología Aplicada (Botánica). Universidad Miguel Hernández. Campus de Elche. Avenida de la Universidad s/n. 03202, Elche (Alicante); email: gdiaz@umh.es

Resumen

El desarrollo de la agricultura ecológica en los últimos años, y la tendencia generalizada a la utilización de prácticas agrícolas que limiten el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas de síntesis, ha generado la demanda de productos alternativos más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente. El desarrollo de nuevos biofertilizantes basados en microorganismos beneficiosos del suelo se presenta como una alternativa muy prometedora. En este trabajo se analiza el efecto de inoculantes basados en *Trichoderma harzianum* y hongos micorrícicos arbusculares como bioestimulantes sobre el desarrollo de plantas de puerro (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* (L.) J.Gay). Para ello se utilizaron 60 plántulas de unos 45 días de edad aproximadamente, en ensayos consistentes en plantaciones en macetas. Se ensayaron 5 tratamientos utilizando diferentes inoculantes (2 ensayos, en sustrato fertilizado y sin fertilizar): **T1.** *Trichoderma harzianum* (Microgaia Biotech); **T2.** *T. harzianum* + hongo micorrícico arbuscular (Microgaia Biotech); ***G****. Glomus intraradices* (CEBAS. CSIC); **M.** *Glomus* sp. (Symborg); **T1+G.** Combinado T1 +G. En general, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que la inoculación con productos basados en microorganismos de la rizosfera, como los hongos micorrícicos y el hongo saprófito *T. harzianum* da lugar a un mejor desarrollo de plantas de puerro, aunque los efectos varían según el biofertilizante usado y las condiciones de fertilidad del sustrato. No se detecto efecto aditivo por la interacción *Trichoderma*–hongo micorrícico arbuscular en crecimiento o colonización radical, pero se mantiene el efecto positivo en crecimiento. En sustrato fertilizado el efecto beneficioso de la aplicación de biofertilizantes es menor que en sustrato no fertilizado. La aplicación de biofertilizantes puede sustituir o reducir la aplicación de fertilizantes químicos, eliminando los efectos colaterales negativos que éstos pueden suponer.

Palabras clave: biofertilizantes, hongos micorricicos, *Trichoderma*, puerros.

Effect of the application of biofertilizers based on mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* on the development of leek plants

Abstract

The increase of organic farming in recent years, and the general trend towards agricultural practices limiting the excessive use of synthetic fertilizers and pesticides, has generated the demand for more environmentally friendly products. The development of new biofertilizers based on beneficial soil microorganisms is thus a very promising alternative. This study analyses the effect of Trichoderma harzianum /arbuscular mycorrhizal fungi-based biofertilizers on the plant growth of leek plants (Allium ampeloprasum var. porrum (L.) J.Gay). Two assays (in fertilized and unfertilized substrate respectively) consisting of plantations in mesocosms of 60 seedlings of approximately 45 days, were performed; five treatments were tested using different inoculants: T1. Trichoderma harzianum (Microgaia Biotech); T2. T. harzianum + arbuscular mycorrhizal fungus (Microgaia Biotech); G. Glomus intraradices (CEBAS. CSIC); M. Glomus sp. (Symborg); T1 + G. Combined T1 + G. In general, the results obtained showed that inoculation with products based on rhizospheric microorganisms, such as mycorrhizal fungi and the saprophytic fungus T. harzianum, leads to better development of leek plants, although the effects varied according to the biofertilizer used and the fertility conditions of the substrate. No additive effect on growth or root colonization due to the interaction Trichoderma – arbuscular mycorrhizal fungus was observed, but the positive effect on growth was maintained. In fertilized substrate, the beneficial

effect of the application of biofertilizers was lower than in unfertilized one. The application of biofertilizers can replace or reduce the use of chemical fertilizers, thus eliminating their negative side effects.

Keywords: biofertilizers, mycorrhizal fungi, *Trichoderma*, leeks.

Introducción

El desarrollo de la agricultura ecológica en los últimos años y la tendencia generalizada a la utilización de prácticas agrícolas que limiten el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas de síntesis ha generado la demanda de productos alternativos más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente. El desarrollo de nuevos biofertilizantes basados en microorganismos beneficiosos del suelo es hoy en día una realidad que se presenta como una alternativa muy prometedora (Vessey, 2003; Barea et al., 2016). El conocimiento de las interacciones que ocurren entre los microorganismos beneficiosos de la rizosfera y su optimización es importante para su aplicación biotecnológica como componentes de estos nuevos biofertilizantes.

Algunos estudios han demostrado que la interacción entre *Trichoderma* y micorrizas arbusculares puede resultar beneficiosa para el crecimiento vegetal (Martínez-Medina et al., 2011), aunque no se conoce demasiado sobre los mecanismos implicados en esta interacción. Parece existir un efecto sinérgico entre *Trichoderma* y la germinación de esporas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y su capacidad de colonización y también una estimulación de la actividad de la micorriza (Brimner y Boland, 2003; Szczałba et al., 2019).

Por ello, se sugiere que los hongos micorrícicos y hongos promotores del crecimiento, como *Trichoderma*, puedan ser aplicados conjuntamente en el mismo inóculo, con la finalidad de aumentar el crecimiento vegetal en términos de productividad y sanidad (Sosa, et al., 2005).

Con estos precedentes y, teniendo en cuenta que no existe apenas información previa sobre el uso de biofertilizantes a base de hongos en *Allium ampeloprasum* var. *porrum* (L.) J.Gay, se plantea analizar el efecto de inoculantes basados en *T. harzianum* y hongos micorricicos arbusculares como agentes de crecimiento, sobre el desarrollo de plantas de puerro.

Material y Métodos

Diseño experimental

Los ensayos consistieron en plantaciones en mesocosmos que se llevaron a cabo en el Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) de la Universidad de Murcia. Se dispusieron en mesas elevadas del suelo, con base de rejilla, bajo umbráculo con malla de sombreo con un 60% de extinción de luz y malla antitrips. El sustrato utilizado consistió en una mezcla de suelo agrícola procedente de los campos experimentales ubicados en el SACE de la Universidad de Murcia, turba y perlita en las proporciones 2:2:1, v/v.

Se emplearon como mesocosmos macetas cilíndricas de 1,5 litros (12 cm de diámetro superior, 9 cm el diámetro inferior y 20 cm de altura). Se utilizaron 60 plántulas de puerro de la variedad Atal de unos 45 días de edad aproximadamente que fueron suministradas por el semillero “EL RAAL-COX, S.l.”, ubicado en la Aparecida (Orihuela-Alicante).

Se ensayaron los siguientes biofertilizantes:

1. *Trichoderma harzianum* cepa TH78, en matriz sólida (polvo), con una riqueza de 5 x 10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colonias) suministrada por Microgaia Biotech S.L. **(T1).**
2. *T. harzianum* cepa TH78 en matriz sólida (polvo) + hongo micorrícico arbuscular, suministrada por Microgaia Biotech S.L. (**T2).**

3. *Glomus intraradices* cepa BEG121, en inóculo consistente en suelo rizosférico, suministrado por el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura **(G).**
4. *Glomus* sp., en inóculo consistente en suelo rizosférico, con una riqueza de 1,2 x 10^4 NMP/g (número más probable de propágulos), suministrado por Symborg SL. **(M).**

Los productos comerciales están en fase de experimentación por lo que se no se facilitan más datos sobre su composición.

Se llevaron a cabo dos ensayos simultáneos, de 9 semanas de duración.

- Ensayo 1: Inoculación de plantas de puerro con diferentes biofertilizantes comerciales en sustrato sin fertilizar.
- Ensayo 2: Inoculación de plantas de puerro con diferentes biofertilizantes comerciales en sustrato fertilizado.

En ambos ensayos el diseño experimental consistió en un factorial al azar de un factor y seis niveles (C, T1, T2, G, M, T1+G), con cinco repeticiones por tratamiento (30 mesocosmos).

Para el Ensayo 2, se usó como fertilizante COMPO® NPK 7-5-6. La dosis suministrada fue de 7 ml de fertilizante disueltos en 1,5 litros de agua, a razón de 50 ml por planta. La fertilización se llevo a cabo en dos ocasiones, la primera a los 40 días del trasplante a la maceta y la segunda a los 50 días.

Las plántulas se inocularon en el momento de la plantación con los diferentes biofertilizantes comerciales a las dosis especificadas en la Tabla 1. Se realizó una única aplicación de cada biofertlizante.

Tabla 1. Tratamientos y dosis utilizadas en los ensayos 1 y 2.

	Tratamiento	**Dosis por planta**
C	Control	-
T1	*Trichoderma harzianum*	1 gramo
T2	*T. harzianum* + hongo micorrícico	1.3 gramos
G	*Glomus intraradices*	6 gramos
M	*Glomus* sp.	5-5.2 gramos
T1+ G	Combinado T1+ G	1gr + 6gr

Las plantas se regaban dos veces por semana con un sistema de microaspersores durante 30 minutos con agua descalcificada de 800-1200 µS, y un apoyo manual con regadera cuando era necesario.

Determinaciones experimentales

- **Crecimiento vegetal**

Se midió la altura de la parte aérea de la planta de puerro. Se determinó el peso seco de la parte aérea y el peso seco de las raíces de cada una de las plantas (secado en estufa a 65 ºC durante 36 horas). Por último, se determinó el diámetro máximo del bulbo y el diámetro de la base de la parte aérea con un calibre digital.

- **Colonización micorrícica**

Se tomó una porción del sistema radical de cada una de las plantas en fresco, que se conservó a 4 ^{0}C hasta que ser procesada. Las raíces se tiñeron con azul tripán siguiendo el método de Philips y

Hayman (1970). La cuantificación de la micorrización se realizó siguiendo el método de Giovannetti y Mosse (1980).

- **Presencia de Trichoderma en el suelo**

Para evaluar la presencia de *Trichoderma* se utilizó la técnica estándar de aislamientos de hongos del suelo mediante diluciones seriadas. Para ello se suspenden las muestras de suelo en agua destilada estéril en proporción 1:10 (ww/v) (10 g de suelo en 90 ml H_2O) y se preparan diluciones seriadas de orden 10. De cada dilución se siembran 100 µl con asa de cultivo en una placa de Petri con medio de cultivo PDA (patata-dextrosa-agar) adicionado con estreptomicina (100 mg/l) y Rosa Bengala (50mg/l). Todo el procedimiento se realiza en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar.

Las placas se incuban en oscuridad a 25 ºC y al cabo de 5 días se efectúa el recuento de las colonias de *T. harzianum* y de otros hongos. El resultado se expresa como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo seco.

Análisis estadístico

Los datos fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA) de un factor y de dos factores usando los paquetes estadísticos Microsoft Office Excel 2007 y SPSS v. 21. Las comparaciones de los valores medios de los diferentes tratamientos se realizaron mediante el test de Duncan, con un nivel de significación $p<0,05$.

Resultados y Discusión

Ensayo 1: Inoculación de plantas de puerro con diferentes biofertilizantes comerciales en sustrato sin fertilizar

El crecimiento de las plantas de puerro estuvo influenciado por la aplicación de biofertilizantes, especialmente en los parámetros relativos a la parte aérea (Tabla 2).

Se observó un efecto positivo en el peso seco de la parte aérea, así como en el diámetro de la base de las hojas con todos los biofertilizantes ensayados. Además, las plantas inoculadas con *Trichoderma* (tratamientos T1 y T2) fueron algo mayores (altura) que el resto, aunque estas diferencias no fueron significativamente diferentes. En cuanto a los parámetros de crecimiento relativos al sistema radical, la inoculación con T1, T2 y M dio lugar a bulbos de mayor diámetro que el control sin inocular. No se detectaron diferencias significativas en el peso seco de la raíz en los diferentes tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de las plantas de puerro inoculadas con diferentes biofertilizantes, en sustrato sin fertilizar.

Tratamiento	Altura (cm)	P seco hojas (g)	∅ parte aérea (mm)	P seco raíz (g)	∅ Bulbo (mm)
C	46,8 a ±7,85	2,64 a ±0,62	5,39 a ±0.40	1,44 a ±0,34	10,71 a ±2,39
T1	54,4 a ±4,04	3,90 b ±1,02	8,64 b ±0,73	1,82 a ±0,28	15,66 b ±2,52
T2	53,3 a ±6,46	4,25 b ±0,96	8,07b ±0,42	1,65 a ±0,19	15,88 b ±2,45
G	46,4 a ±9,96	4,04 b ±0,43	8,13 b ±2,43	1,84 a ±0,38	13,23 ab ±6,68
M	51,6 a ±6,91	3,82 b ±0,47	8,90 b ±1,15	1,36 a ±0,33	14,51 ab ±0,59
T1+G	45,3 a ±5,22	3,41 b ±0,57	7,32 b ± 0,81	1,57 a ±0,40	14,98 ab ±2,42

C: control; **T1:** *T. harzianum;* **T2:** *T. harzianum* + hongo micorricico arbuscular*;* **G**: *Glomus intraradices;* **M:** *Glomus sp.*
Los valores son media y desviación típica (n=5). Para cada variable, los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente diferentes (test de Duncan, $p<0.05$).

Las variables peso seco de las hojas y diámetro de la parte aérea parecen estar influenciados por la inoculación cuando se consideran todos los biofertilizantes ensayados (Tabla 3). Si se consideran únicamente los tratamientos a base de *T. harzianum* (T1, T2, T1+G) también el diámetro del bulbo resulta afectado, y a un nivel de significación estadística mayor para el resto de las variables (Tabla 4).

Tabla 3. ANOVA de un factor: Inoculación con biofertilizante (Niveles: Control, T1, T2, G, M, T1+G). Valores de *p* significativos< 0,05.

Variables	Inoculación con biofertilizante (P)
Altura	n.s
P seco hojas	0,022
∅ hojas	0,001
P seco raíz	n.s
∅ bulbo	n.s

Tabla 4. ANOVA de un factor: Inoculación con biofertilizante Trichoderma harzianum (Niveles: Control, T1, T2). Valores de *p* significativos <0,05.

Variables	Inoculación con biofertilizante (P)
Altura	n.s
P seco hojas	0,033
∅ parte hojas	$1,276*10^{-6}$
P seco raíz	n.s
∅ bulbo	$9,2 *10^{-3}$

Ensayo 2: Inoculación de diferentes biofertilizantes comerciales en plantas de puerro en sustrato fertilizado.

Se observó un aumento significativo del peso seco de la parte aérea con la inoculación de *T. harzianum* en combinación con micorriza (T2). No se detectaron diferencias significativas para el resto de las variables (altura, diámetro del bulbo y diámetro de la base de las hojas) en el sustrato fertilizado (Tabla 5).

En cuanto a las raíces, en general no se observó un efecto de la inoculación con los biofertilizantes aplicados (Tabla 5). Igualmente, al considerar únicamente los biofertilizantes a base de *T. harzianum* ninguna variable resultó significativa.

Tabla 5. Parámetros de crecimiento de las plantas de puerro inoculadas con diferentes biofertilizantes, en sustrato fertilizado.

Tratamiento	Altura (cm)	P seco hojas (g)	P seco raíz (g)	∅ Bulbo (mm)	∅ hojas (mm)
C	49,2 a ±4,77	2,69 ab ±0.93	1,15 a ±0,50	12,02 a ±3,56	7,67 a ±1,91
T1	50,7 a ± 6,72	2,82 ab ±0,34	1,58 a ±0,60	11,84 a ±1,67	7,29 a ±0,97
T2	52,2 a ±5,63	3,57 c ±0,36	1,38 a ±0,40	13,23 a ±1,23	8,57 a ±0,60
G	45,1 a ±3,29	2,87 ab ±0,44	1,51 a ±0,15	14,38 a ±1,93	8,68 a ±0,83
M	46,7 a ±9,09	2,31 a ±0,79	1,10 a ±0,39	12,17 a ±2,24	7,53 a ±0,98
T1+G	51,9 a ±4,04	2,47 a ±0,65	1,11 a ±0,31	12,75 a ±2,74	7,76 a ±1,20

C: control; T**1:** T. harzianum; **T2:** T. harzianum + hongo micorrícico arbuscular; **G**: Glomus intraradices; **M:** Glomus sp. Los valores son media y desviación típica (n=5). Para cada variable, los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente diferentes (test de Duncan, $p<0.05$).

Si se consideran el conjunto de los datos obtenidos en los dos ensayos, se comprueba que la inoculación es significativa para el peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y diámetro de la parte aérea. La fertilización es significativa para peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y diámetro del bulbo. Por otro lado, se detectan interacciones entre ambos factores únicamente para el diámetro de la parte aérea (Tabla 6).

Tabla 6. ANOVA de dos factores: Inoculación con todos los biofertilizantes (Niveles: Control, T1, T2, G, M y T1+G). Valores de *p* significativos.

	Inoculación	**Fertilización**	**I x F**
Altura	n.s	ns	n.s
P seco hojas	0,003	<0,0001	n.s
P seco raíz	0,029	0,003	n.s
⌀ Bulbo	n.s	0,014	n.s
⌀ Hojas	0,008	n.s	0,011
% micorrización	< 0,001	< 0,001	0.007

Colonización micorrícica

Como era de esperar, en los dos ensayos, tanto el tratamiento control como el T1 no presentaron colonización micorrícica.

En sustrato sin fertilizar (ensayo 1), las plantas inoculadas con *T. harzianum* + hongo micorrícico (tratamiento T2) presentaron elevados niveles de colonización micorrícica, cercanos al 80%. En el resto de tratamientos, en cambio, la colonización micorrícica fue muy baja, inferior al 10% (Figura 1A).

En sustrato fertilizado (ensayo 2) las plantas inoculadas con *T. harzianum* + hongo micorrícico (tratamiento T2) presentaron también elevados niveles de colonización micorrícica, cercanos al 80%. El resto de tratamientos, en cambio, mostraron una colonización muy baja, inferior al 10% en el tratamiento M, con ausencia de micorrización en los tratamientos G y T1+G (Figura 1B).

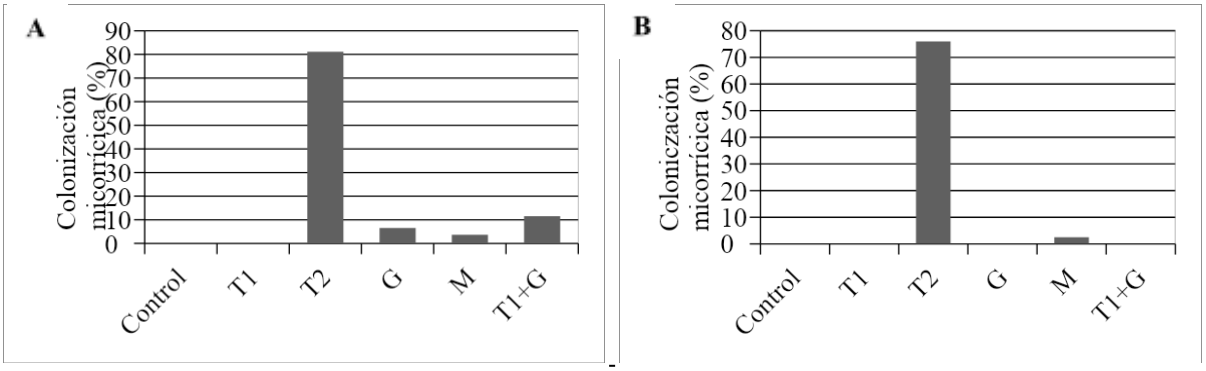


Figura 1. A: Porcentaje de colonización micorrícica en plantas de puerro inoculadas con diferentes biofertilizantes, en sustrato sin fertilizar (A) y en sustrato fertilizado (B).

Presencia de *Trichoderma harzianum* en el suelo

En todos los tratamientos donde se inoculó un biofertilizante basado en *T. harzianum* (T1, T2, T1+G) se recuperaron poblaciones de *T. harzianum* del orden de 10^3 o 10^4 UFC/g. En sustrato sin fertilizar, los valores mayores se obtuvieron en el tratamiento T1 + G (Figura 2A), mientras que en sustrato fertilizado se obtuvieron para los tratamientos T2 y T1 + G (Figura 2B).

No se detectaron colonias de *T. harzianum* en los tratamientos que no fueron inoculados con este hongo (C, G y M).

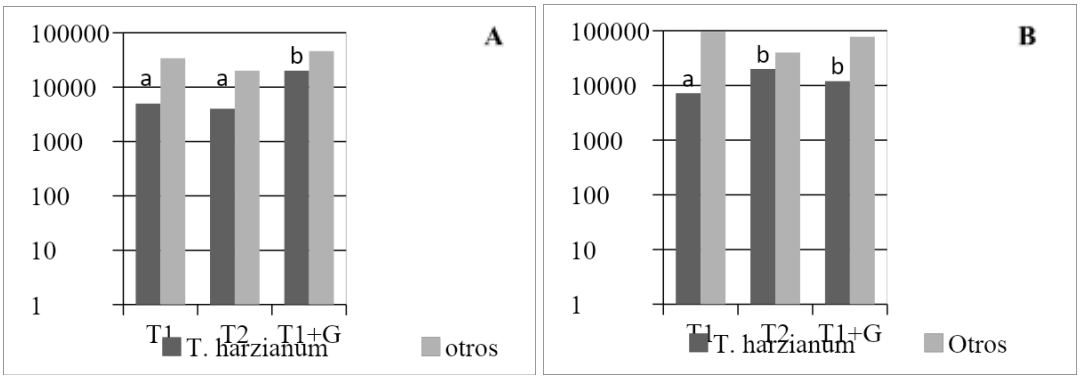


Figura 2. Número de colonias de *Trichoderma harzianum* y otros hongos del suelo en el ensayo 1 (A) y en el ensayo 2 (B).

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que la inoculación con productos basados en microorganismos de la rizosfera, como los hongos micorrícicos y el hongo saprófito *T. harzianum* da lugar a un mejor desarrollo de plantas de puerro, aunque los efectos varían según el biofertilizante usado y las condiciones de fertilidad del sustrato.

Es un hecho generalmente aceptado que las micorrizas mejoran el crecimiento de las plantas (Azcón-Aguilar et al. 2009; Smith y Read, 2008) y que, en general, este efecto beneficioso disminuye o desaparece cuando hay elevados niveles de fertilización, pues la planta puede obtener fácilmente los nutrientes inorgánicos sin la contrapartida de aportar productos carbonados. En nuestro caso, parece existir también esta tendencia, pues los productos inoculados sólo a base de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (tratamientos G, M) indujeron un efecto positivo en algunas variables (peso seco de la parte aérea, diámetro del tallo, diámetro del bulbo) pero únicamente en el ensayo donde no se aportó fertilización.

Sin embargo, parece difícil explicar los resultados de crecimiento con los bajos niveles de colonización micorrícica obtenidos en estos tratamientos (G, M, T1+G), a pesar de que algunos estudios constatan efectos positivos en crecimiento con bajos porcentajes de micorrización. Una posible explicación es el efecto coadyuvante de sustancias químicas o de microorganismos que pudieran estar presentes en los inóculos aplicados, tanto el biofertilizante comercial (tratamiento M) como el inóculo experimental (tratamiento G), pues ambos consisten en definitiva en suelo rizosférico con elevada actividad bioquímica y microbiana (Johansson et al. 2004). Es frecuente además en inóculos comerciales adicionar algún compuesto de actividad fitoestimuladora. En cualquier caso, para poder dilucidar el efecto de las micorrizas en el crecimiento de las plantas, así como de la interacción con *Trichoderma* parece conveniente tener evidencia de que son debidos a una exitosa colonización radical, por lo que no podemos obtener conclusiones en este sentido.

Los bajos niveles de colonización detectados podrían deberse a una pérdida de viabilidad de los propágulos del inóculo. Una de las mayores limitaciones a la hora de manipular fertilizantes basados

en HMA es que son simbiontes obligados, lo que hace necesaria su multiplicación con plantas asociadas. Además, por tratarse de organismos vivos, los problemas de conservación y viabilidad en el tiempo deben ser tenidos en cuenta en el desarrollo y formulación de productos comerciales. El inóculo G, a base de *G. intraradices* se ha utilizado previamente en otros experimentos, obteniéndose una elevada tasa de colonización (Martínez-Medina et al., 2011) lo que sugiere que en este ensayo ha podido perder viabilidad.

Los niveles de colonización fueron incluso menores en el ensayo 2, donde se aportó fertilización, lo que pone de manifiesto el hecho ampliamente constatado de la fertilización afecta negativamente a la extensión del hongo dentro de la raíz (Barea et al., 2016). Esto habría que tenerlo en cuenta a la hora de seleccionar especies y cepas de hongos para su uso en inoculantes en agricultura que sean compatibles con otro tipo de fertilización. En el caso del tratamiento T2 (*T. harzianum* + HMA), este hecho no ocurre, al menos en las condiciones ensayadas en este estudio. El examen microscópico reveló además una elevada capacidad de colonización, con gran cantidad de vesículas, arbúsculos y micelio extra e intraradical. Todo ello lo hace aparecer como un buen candidato a ser usado en formulados comerciales.

La interacción entre *T. harzianum* y HMA en términos de colonización micorrícica no está del todo clara. Mientras algunos estudios ponen de manifiesto una acción sinérgica (García-Romera et al., 1998; Martínez-Medina et al., 2011), otros trabajos revelan un efecto antagonista (Martínez et al., 2004). Parece ser que la producción de exudados solubles y componentes volátiles por parte de *Trichoderma* podría influir en el efecto sinérgico. En nuestro caso, la inoculación conjunta de HMA y del saprófito *T. harzianum* en el tratamiento T2 dio lugar a muy elevados niveles de colonización micorrícica, lo que sugiere la compatibilidad de ambos hongos. La inoculación conjunta de *T. harzianum* y G. *intraradices* en el tratamiento T1+G mantuvo o incluso aumentó el nivel de colonización obtenido con *G. intraradices* sin *T. harzianum* (tratamiento G), lo que corrobora la hipótesis anterior. Ello a pesar de que los porcentajes son demasiado bajos para obtener conclusiones definitivas.

Por otro lado, existe también una demostrada interacción entre *Trichoderma* y HMA en cuanto a las poblaciones de *Trichoderma* en el suelo, que parece variar dependiendo de las cepas del hongo micorrícico y del saprófito consideradas (Martínez et al., 2004). De los resultados obtenidos en el presente trabajo se desprende de nuevo que las cepas utilizadas en el tratamiento T2 son compatibles, pues los niveles de poblaciones de *T. harzianum* fueron similares en la coinoculación con respecto a la inoculación solo con *T. harzianum* (tratamiento T1).

En sustrato sin fertilizar, la inoculación con *T. harzianum*, solo o en combinación con HMA (tratamientos T1 y T2) produjo un incremento en el desarrollo de la parte aérea de las plantas de puerro, con efectos significativos en el peso fresco y seco de la parte aérea, diámetro del tallo y diámetro del bulbo. Aunque el hongo *Trichoderma* y en particular la especie *T. harzianum* se ha usado ampliamente como agente de biocontrol frente a enfermedades fúngicas su efecto como fitoestimulador está menos estudiado.

La aplicación combinada de *T. harzianum* y HMA (tratamiento T2) supuso asimismo un efecto beneficioso en el crecimiento de las plantas, pero aparentemente no existe un efecto sinérgico, sino que los valores de las variables evaluadas se mantuvieron similares a los de las plantas inoculadas solo con *Trichoderma* (tratamiento T1). Otros trabajos, en cambio constatan un efecto aditivo con la coinoculación, aunque este comportamiento no es una tendencia generalizada, sino que parece variar según las características de las cepas de *Trichoderma* y HMA implicadas (Saldanejo et al., 2008; Martínez-Medina et al., 2011; Szczałba et al., 2019). En cualquier caso, sería conveniente evaluar otras variables para poder detectar posibles efectos sinérgicos en captación de nutrientes, defensa frente a patógenos, resistencia a otros estreses, mejora de las propiedades del suelo, etc, que pudieran ser

aportados por el componente micorrícico y que son importantes para especies de plantas de interés agrícola como el puerro en un contexto de agricultura sostenible.

En sustrato fertlizado, sin embargo, los efectos beneficiosos de la inoculación con *Trichoderma* solo o en combinación con HMA (tratamientos T1 y T2) fueron menos patentes, con efectos significativos solo en peso fresco de la parte aérea, aunque en este caso el incremento fue mayor cuando la inoculación se efectuó conjuntamente con HMA (tratamiento T2). Se constata así que cuando los biofertilizantes se aplican en sustrato fertilizado se obtienen beneficios en el crecimiento de la planta menores que cuando se aplican en sustrato fertilizado, siempre en relación al tratamiento control. De acuerdo con Rabeendran et al. (2000) cuando las plantas crecen en condiciones óptimas, la estimulación del crecimiento mediada por *Trichoderma* es menos acentuada.

Conclusiones

Se puede afirmar pues, que el uso de formulados basados en microorganismos de la rizosfera puede contribuir a reducir el consumo de fertilizantes químicos de síntesis en el cultivo de puerro ya que producen un incremento en el crecimiento de las plantas. Debe controlarse la viabilidad y persistencia de los microorganismos utilizados, con el fin de asegurar una adecuada colonización. Los productos T1 y T2, a base de *T. harzianum* y un hongo micorrícico arbuscular son compatibles con un régimen moderado de fertilización, pero su uso es más recomendable sin fertilización adicional.

Agradecimientos

A Microgaia Biotech S.L., Symborg S.L. y Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (Drs. A. Roldán y J.A. Pascual) por el suministro de los biofertilizantes utilizados.

Bibliografía

Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. 2009. Mycorrhizas: Functional Processes and Ecological Impact. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón-Aguilar, C. 2016. Significado y aplicación de las micorrizas en agricultura. Agricultura 999: 866-871.

Brimner, T. y Boland, G.J. 2003. A review of the nontarget effects of fungi used to biologically control plant diseases. Agric. Ecosyst. Environ. 100: 3-16.

García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Martín, J., Fracchia, S., Mújica, M.T., Godeas, A., Ocampo, J.A. 1998. Interactions between saprotrophic *Fusarium* strains and arbuscular mycorrhizas of soybean plants. Symbiosis 24: 235-246.

Giovanetti, M., Mosse, B., 1980. An evolution of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489-499

Johansson, J., Paul, L.R., Finlayu, R.D. 2004. Microbial nteractions in the Mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Micr.Ecol. 48: 1-13.

Martínez, A., Obertello M., Pardo, A., Ocampo, J.A., Godeas, A. 2004. Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. Mycorrhiza 14: 74-84.

Martínez-Medina, A., Roldán, A., Pascual. J.A. 2011. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: Growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. Applied Soil Ecology 47: 98–105

Phillips, J.M., Hayman, D.S. 1970. Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161.

Rabeendran, N., NMoot, D.J., Jones, E.E., Stewart, A. 2000. Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. New Zealand Plant Protection 53: 143-146.

Saldajeno, M.G.B., Chandanie, W.A., Kubota, M., Hyakumachi, M. 2008. Effects of interactions of arbuscular mycorrhizal fungi and beneficial saprophytic mycoflora onlant growth and disease protection. In: Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S., Futai, K. (Eds.). Springer Sciences, Netherlands, pp. 211-226.

Smith, S. E., Read, D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Ed. Elsevier, Academic Press, New York.

Sosa, T., Sanchez, J., Morales, E., Cruz, Fernando, 2005. Interacción micorrizas arbusculares-*Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiarea decumbes* (Poaceae). Acta Biológica Colombiana, Vol 11, 2006.

Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571-586.

Szczałba, M., Kopta, T., Gąstoł, M. and Sękara, A. 2019. Comprehensive insight into arbuscular mycorrhizal fungi, *Trichoderma* spp. and plant multilevel interactions with emphasis on biostimulation of horticultural crops. J. Appl. Microbiol, 127: 630-647.

Sesión 6:

Gestión y Valorización de Residuos Orgánicos en la Agricultura.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Efectos del tipo de estiércol en la evolución de su co-compostaje con residuos vegetales y en la calidad agronómica del compost obtenido

C. Santiago-Cubas [1] y C. Paredes [2]

[1] Terracan Compost, Pol.Ind. Félix Santiago Melián, C/Félix García Glez s/n, 35458-Santa Maria de Guía (Las Palmas) y e-mail: maria.santiago04@goumh.umh.es / info@terracancompost.com
[2] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3,2, 03312-Orihuela (Alicante)

Resumen

Durante las últimas décadas, se ha observado un aumento de la población, con una mayor producción de alimentos, y una concentración de habitantes en las ciudades. Este hecho ha provocado un incremento en la generación de residuos orgánicos de origen urbano, agrícola y ganadero, los cuales demandan una gestión adecuada que permita el reciclado del residuo generado. En este sentido, el compostaje puede ser un tratamiento factible para reciclar estos residuos, y, por lo tanto, mejorar sus propiedades para su uso agrícola. De este modo, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tipo de estiércol durante su co-compostaje con residuos orgánicos de origen municipal y agrícola de la zona noroeste de la isla de Gran Canaria, para el uso posterior de los compost obtenidos como enmienda orgánica en suelos o como sustrato para el cultivo sin suelo. Para ello, se utilizaron tres tipos de estiércol: gallinaza, estiércol de cabra y estiércol de vaca, los cuales se sometieron a un proceso de co-compostaje mezclándolos con residuos vegetales procedentes de jardines municipales y de residuos de cultivos agrícolas, en las siguientes proporciones (sobre peso fresco): 37,6% paja +32,7% estiércol +29,7% poda. El sistema de compostaje empleado fue un sistema dinámico abierto de hileras volteadas, conformándose tres pilas trapezoidales de 1,5 metros de altura x 2,5 metros de ancho y de 16 metros de longitud. Durante el proceso de compostaje se estudió la evolución de la temperatura, la humedad y de diferentes parámetros físico-químicos y químicos, y también se evaluó el valor agrícola, la higienización y la madurez de los compost obtenidos. Los resultados obtenidos mostraron que las tres pilas consiguieron una adecuada higienización de acuerdo a los requerimientos térmicos establecidos en la normativa (temperatura ≥ 60ºC durante al menos 7 días) y se obtuvo un producto final o compost apto para su utilización agrícola.

Palabras clave: Residuos orgánicos, compost, degradación de la materia orgánica, calidad agrícola, higienización.

Effects of the manure type on the evolution of its co-composting with plant residues and on the agronomic quality of the compost obtained

Abstract

During the last decades, there has been an increase in population, with increased food production, and a concentration of inhabitants in cities. This fact has led to an increase in the generation of organic waste of urban, agricultural and livestock origin, which requires adequate management that allows the recycling of the waste generated. In this sense, composting can be a feasible treatment to recycle this waste, and, therefore, improve its properties for agricultural use. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of the type of manure during its co-composting with organic waste of municipal and agricultural origin from the northwest of the island of Gran Canaria, for the subsequent use of the compost obtained as organic amendment in soils or as a substrate for soilless cultivation. For this, three types of manure were used: chicken manure, goat manure and cow manure, which were subjected to a co-composting process mixing them with plant residues from municipal gardens and agricultural crop residues, in the following proportions (on fresh weight): 37.6% straw + 32.7% manure + 29.7% pruning. The composting system used was an open dynamic system of overturned rows, forming three trapezoidal piles 1.5 meters high x 2.5 meters wide and 16 meters long. During the composting process, the evolution of temperature, humidity and different physical-chemical and chemical parameters were

studied, and the agricultural value, sanitation and maturity of the compost obtained were also evaluated. The results obtained showed that the three piles achieved adequate sanitation according to the thermal requirements established in the regulations (temperature ≥ 60ºC for at least 7 days) and a final product or compost suitable for agricultural use was obtained.

Keywords: Organic waste, compost, degradation of organic matter, agricultural quality, sanitation.

Introducción

Durante las últimas décadas, se ha producido una gran cantidad de residuos agropecuarios en la isla de Gran Canaria, cuya gestión es necesaria y que se ve agravada por la condición de insularidad, a lo que se suma el avanzado deterioro de los suelos ubicados en zonas definidas como vulnerables por el Decreto 49/2000, de 10 de abril, por el que se determinan las masas de agua afectadas por la contaminación de nitratos de origen agrario y se designan las zonas vulnerables por dicha contaminación. Además, es necesario reducir una de las prácticas agrícolas más perjudiciales donde se trata a los suelos como 'vertederos encubiertos', aplicándose de forma masiva y continuada todo tipo de estiércoles. Esta aplicación de estiércol en tierras agrícolas podría causar daños ambientales, incluida la contaminación atmosférica por emisión de gases de efecto invernadero (Romero et al., 2021) y la contaminación de suelos y recursos hídricos debido a la propagación de patógenos y productos farmacéuticos (Ghirardini et al., 2020), así como al exceso de nutrientes (Zhongqi et al., 2016; Reid et al., 2018), que afectaría de forma negativa a las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos, comentadas anteriormente.

En este contexto, el compostaje se considera una tecnología estratégica para la sostenibilidad de las actividades agrícolas que puede resolver problemas críticos como la eliminación de estiércoles con bajo coste e impacto ambiental. Para llevar a cabo este proceso de compostaje es necesario el co-compostaje de los estiércoles con residuos vegetales que aporten la porosidad necesaria a la mezcla para que haya un intercambio gaseoso adecuado durante el proceso de compostaje. Además, los antibióticos y patógenos que contienen los estiércoles podrán degradarse y reducirse, respectivamente, durante el proceso de compostaje (Li et al., 2021; Xie et al., 2021). Por ello, en varios trabajos se ha reportado la adición de residuos vegetales a estiércoles para su co-compostaje, aumentando así la actividad de los microorganismos y el mantenimiento de la etapa termofílica para obtener un material final libre de fitotoxinas y desinfectado y con una materia orgánica estabilizada y humificada (Bustamante et al., 2008; Gavilanes-Terán et al., 2016; Afonso et al., 2021).

Por otro lado, los compost obtenidos se pueden utilizar como enmienda orgánica o fertilizante en el área de generación de estos desechos, reduciendo así el uso de fertilizantes inorgánicos y promoviendo un crecimiento económico eficiente con impactos ambientales reducidos. Actualmente, hay una gran demanda de compost en la isla, ya que son empleados principalmente en la agricultura de la zona dominada por la Sociedad Agrícola de Conagrican y la Sociedad Agraria de Transformación de Costa Caleta, dedicadas al cultivo intensivo de plataneras. Otros cultivos de destino cercanos son el papayo y la piña tropical bajo régimen de cultivo protegido. Otros destinos del compost son los altos o medianías de la isla de los Municipios de Guía y Arucas para almendros y manzanos y, por último, también se dirige al sur de la isla en cultivos maracuyá y otros frutales subtropicales.

En función de lo anteriormente mostrado, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar los efectos de tres tipos de estiércoles (gallinaza, estiércol de cabra y estiércol de vaca) durante la evolución de su co-compostaje con residuos orgánicos de origen municipal y agrícola de zonas cercanas, y su influencia en la calidad agronómica de los compost obtenidos.

Material y Métodos

El proceso de compostaje se llevó a cabo dentro de las instalaciones Terracan Compost, Santa Maria de Guía (Las Palmas). Se prepararon tres pilas de compostaje con diferentes estiércoles, residuos de poda y paja de trigo. Las características de los materiales iniciales utilizados fueron los que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características fisico-quimicas y químicas de los residuos iniciales.

Residuos	H (%)	CE (dS/m)	pH	MO (%)	COT (%)	NT (%)	P (%)	K (%)	COT/NT
Poda	10,92	4,43	6,76	87,2	50,6	1,47	0,30	3,17	34,4
Paja	9,45	1,00	6,93	92,1	53,4	0,56	0,07	1,59	95,4
Gallinaza	39,80	7,11	8,64	50,0	29,0	3,36	3,53	5,36	8,6
Est. Cabra	19,81	5,94	8,28	65,6	38,1	2,41	1,10	5,92	15,8
Est. Vaca	46,40	7,16	10,21	43,6	20,1	1,19	0,73	4,33	16,9

H: humedad; CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; COT: carbono orgánico total; NT: nitrógeno total.

Los residuos se mezclaron en las siguientes proporciones en peso fresco:

Pila 1 (CP1) = 29,7%poda+32,7%gallinaza+37,6%paja de trigo

Pila 2 (CP2) = 29,7%poda+32,7%estiércol de cabra+37,6%paja de trigo

Pila 3 (CP3) = 29,7%poda+32,7%estiércol de vaca+37,6%paja de trigo

Todas las pilas se compostaron mediante el sistema de pila móvil, con aireación por volteos, y con una sección trapezoidal al inicio de unas dimensiones de 1,5 m de alto x 2,5 m de ancho x 16 m de largo. Además, se compostaron bajo cobertores textiles para proteger a las pilas de la lluvia y del viento. Estos cobertores permitieron la transpiración e intercambio de gases. Al inicio del proceso se realizaron varios pases de volteadora para homogeneizar la mezcla y en la fase bio-oxidativa los volteos fueron periódicos según las necesidades requeridas de oxígeno para la biomasa, realizándose volteos cada tres o cinco días al principio, semanales en la fase termófila y luego cada vez más espaciados en el tiempo. Estos volteos se llevaron a cabo más a menudo cuando se produjo una caída de la temperatura o la temperatura subió por encima de 65ºC. La fase bio-oxidativa se consideró terminada cuando la temperatura fue cercana a la temperatura ambiental (105, 95 y 65 días para CP1, CP2 y CP3, respectivamente), dejando madurar a las pilas por un período posterior de un mes. La temperatura y la humedad se controlaron diariamente. La humedad de las mezclas se ajustó a valores entre 40-60% durante la mayor parte del proceso mediante su riego con el agua necesaria. Se realizaron un total de cuatro muestreos en todas las pilas a lo largo del proceso de compostaje, correspondientes a las fases de inicio del proceso, fase termófila, final de la fase de enfriamiento y final de la fase de maduración. El muestreo de la pila se realizó tomando siete submuestras de siete puntos diferentes, a lo largo del perfil de la pila, de modo que la muestra final tomada fuese representativa de la totalidad del material en el momento de la recogida. Las muestras recogidas fueron secadas, molidas y tamizadas a un tamaño inferior a 0,5 mm, previamente a su análisis. En los materiales iniciales y en las muestras obtenidas durante el proceso de compostaje, la humedad, la

conductividad eléctrica (CE), pH, la materia orgánica (MO), el nitrógeno total (NT), el carbono orgánico total (COT), el contenido de macronutrientes y de metales pesados y la presencia de microorganismos patógenos se determinaron según los métodos analíticos descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Determinaciones realizadas y sus métodos analíticos.

Determinaciones	Metodología
Humedad	PTA-FQ-024, desecación a 105°C
Materia seca	PTA-FQ-024, desecación a 105°C
Conductvidad eléctrica en extracto 1/5 (v/v)	PTA-FQ-005, conductímetro, basado en UNE- EN 13038
pH en extracto 1/10 (p/v)	PTA-FQ-004, pH-metro, basado en UNE-EN 13037
Cenizas	PTA-FQ-022, calcinación a 540ºC, basado en UNE-EN 13039
Materia orgánica total (MOT)	PTA-FQ-022, calcinación a 540ºC, basado en UNE-EN 13039
Carbono orgánico total (COT)	PTA-FQ-022, cálculo matemático
Nitrógeno total (NT)	PTA-FQ-036, Dumas, basado en UNE-EN 13654-2
Fósforo total	PTA-FQ-029, Extracción basado en UNE-EN 15956, ICP-AES basado en UNE-EN 16963
Potasio total	PTA-FQ-027, ICP-AES basado en UNE-EN 16963
Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn	PTA-FQ-027, ICP-AES basado en UNE-EN 16963
Cromo VI	PTA-FQ-034, HPLC-UV, basado en UNE-EN 16318
Recuento de Escherichia coli por NMP	PTAMC 042. Número más probable miniaturizado
Investigación de Salmonella spp	PTA-MC-025. Aislamiento e identificación, basado en ISO 6579-1

Resultados y Discusión

En la figura 1 se representan los diferentes perfiles de temperatura de las tres pilas de estudio con respecto a la temperatura ambiente. La CP1 alcanzó los valores más altos de temperatura (72,9°C) desde el quinto día, consiguiendo mantener estas temperaturas mayores de 60°C durante los siete primeros días. La CP2 llegó a la etapa termofílica desde el tercer día, alcanzando la temperatura de 71,3°C al cuarto día y con temperaturas por encima de 60°C durante catorce días consecutivos, al principio del proceso. En la CP3 la temperatura media mayor fue de 71,3°C, temperatura máxima a la que llegó el sexto día, y a partir de este día las temperaturas se mantuvieron por encima de 60°C durante ocho días. Este rápido incremento de la temperatura al inicio del proceso de compostaje también ha sido observado por otros autores al co-compostar estiércoles con residuos vegetales (Ali et al., 2014; Gavilanes-Terán et al., 2016; Afonso et al., 2021). En todas las pilas se observó un aumento de temperatura después de cada volteo, debido a la mejora de la oxigenación y la homogeneización de la mezcla. La etapa bioxidativa en la CP1 se alargó un periodo de 105 días, en la CP2 unos 95 días

aproximadamente y la CP3 se consideró la más efectiva con una duración de 65 días. Una vez acabada la etapa bio-oxidativa las pilas maduraron en la nave de maduración, sin realizar volteos, durante un periodo de un mes. En todas las pilas, se mantuvo las temperaturas >60°C durante más de siete días. De este modo, se consiguió la destrucción de semillas de malas hierbas, huevos y larvas de insectos y de microorganismos patógenos, de acuerdo con los requerimientos europeos sobre higienización de compost (Reglamento (UE) 2019/1009, por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE).

En la tabla 3 se muestran las principales propiedades físico-quimicas y químicas de las pilas durante el proceso de compostaje. En la etapa inicial del proceso, el pH de la CP3 con un valor de 9,61, que fue el más elevado, descendió a lo largo del proceso. Sin embargo, en las pilas CP1 y CP2 se observó un aumento del pH durante el compostaje, debido a la degradación de compuestos de carácter ácido tales como grupos fenólicos y carboxílicos, y a la mineralización de proteínas, aminoácidos y péptidos a amoníaco (Paredes et al., 2000). Los valores finales de pH de todos los compost fueron bastante altos. Por lo tanto, se tendrán que adicionar productos de carácter ácido como azufre micronizado, para que la aplicación agronómica de estos compost sea adecuada.

La CE tiende generalmente a aumentar durante el proceso de compostaje debido a la mineralización de la materia orgánica, hecho que produce un aumento de la concentración de nutrientes. Ocurre a veces un descenso de la CE durante el proceso, lo que puede deberse a fenómenos de lixiviación en la masa, provocados por una humectación excesiva de la misma o por la lluvia, si el proceso se realiza al aire libre. En la tabla 3 se expone la evolución de la CE de las tres pilas de estudio durante el proceso de compostaje, donde se puede observar estos aumento y disminuciones de este parámetro. Al final todos los compost presentaron un contenido de sales mayor que el que tuvo la mezcla inicial de residuos, con valores de CE altos (CE final (CP1) = 7,60 dS/m; CE final (CP2) = 5,65 dS/m; CE final (CP3)= 7,46 dS/m), pudiendo este hecho limitar su uso como fertilizantes orgánicos en cultivos sensibles a la salinidad o en suelos con problemas de salinización.

El porcentaje de MO decreció desde valores de 51,7, 51,1 y 53,8% hasta 30,2, 31,9 y 29,7% en las pilas CP1, CP2 y CP3, respectivamente (tabla 3). En todas las pilas se observó que la mayor pérdida de materia orgánica se produjo durante la fase bio-oxidativa (fase mesófila + fase termófila + fase de enfriamiento), siendo las pérdidas durante la fase de maduración menores. Esta relativa estabilidad de las pilas después de la fase bio-oxidativa ha sido reportada también por otros autores durante el co-compostaje de residuos vegetales con estiércoles (Paredes et al., 2000, Bustamante et al., 2008, Gavilanes-Terán et al., 2016).

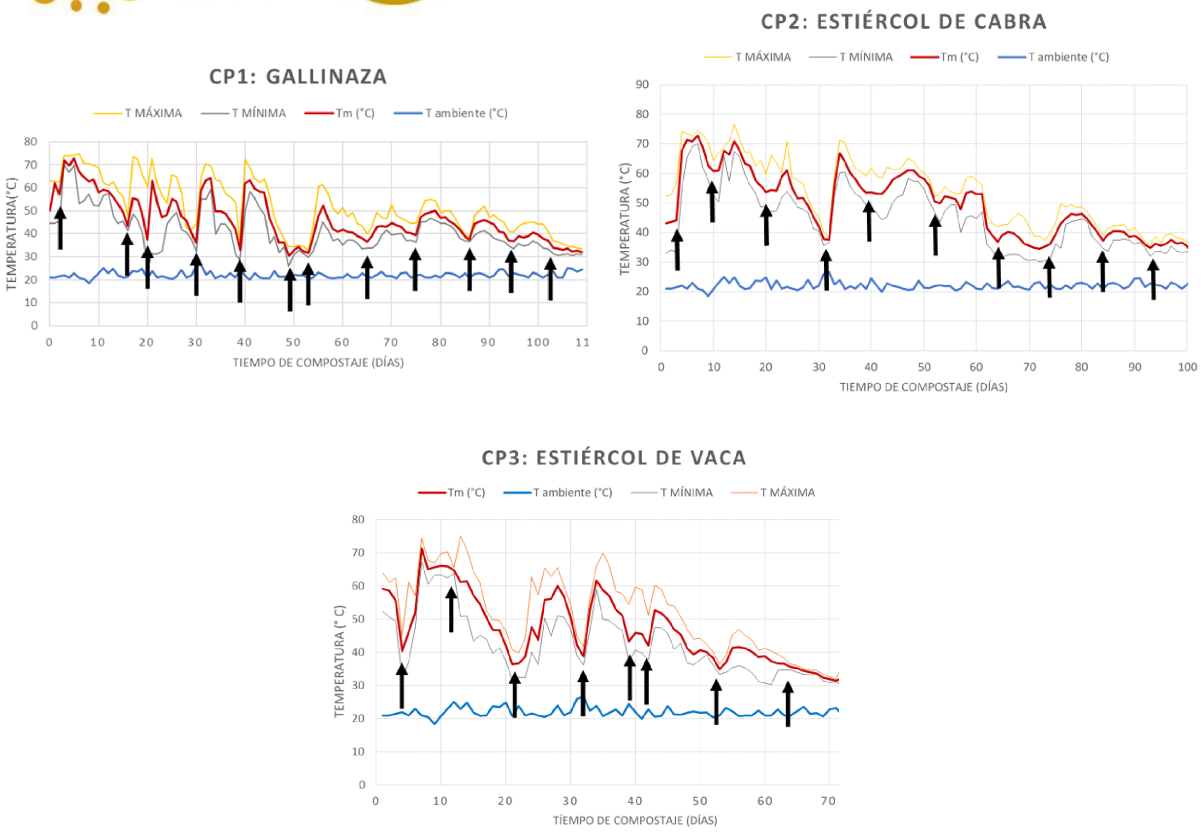


Figura 1. Evolución de la temperatura con respecto a la temperatura ambiente de cada una de las tres pilas. A) CP1:37,6%paja+32,7%gallinaza+29,7% de poda; B) CP2: 37,6%paja+32,7%estiércol de cabra+29,7% de poda y C) CP3: 37,6%paja+32,7%estiércol de vaca+29,7% de poda. Las flechas indican los días donde se realizaron los volteos.

Como puede observarse también en la tabla 3, los porcentajes de COT iniciales tuvieron valores semejantes de 30,0, 29,7 y 31,2% para las pilas CP1, CP2 y CP3 respectivamente. La pila CP3, con estiércol vacuno, fue la que sufrió el mayor descenso de este parámetro, presentando como valor final 17,22 % de COT. Lo contrario sucedió con la pila CP2, con estiércol de cabra, que con un valor inicial menor que la CP3 quedó al final con un valor de COT de 18,52%, que resultó ser el mayor valor final de COT. Con el transcurso del tiempo, el porcentaje de COT de las pilas experimentó un progresivo descenso mayor durante la fase bioxidativa, permaneciendo prácticamente constante en la fase de maduración, lo cual es indicativo de la estabilización de la MO en las tres pilas.

Respecto al NT, la evolución general de este parámetro fue de una disminución a lo largo del proceso (tabla 3). Esta disminución puede atribuirse a las pérdidas por volatización del gas NH_3, que son inevitables durante los volteos de la pila, así como a las pérdidas de nutrientes por lixiviación durante los riegos. En las pilas CP1, con gallinaza, y CP2, con estiércol de cabra, estas pérdidas fueron mayores durante la fase bio-oxidativa, mientras que en la pila CP3 al final de la etapa de enfriamiento la concentración de NT aumentó. El aumento de NT que se produjo en la pila CP3 pudo deberse al predominio del efecto concentración frente a las pérdidas por volatilización y lixiviación. Este efecto concentración es provocado por la pérdida neta de masa seca como CO_2, así como a la pérdida de agua por evaporación debido al desprendimiento de calor durante la oxidación de OM (Paredes et al., 2000). En cuanto a la mayor riqueza de este nutriente en los compost finales, fue la pila con gallinaza (CP1) la que presentó mayor contenido final de NT, incluso tras las pérdidas por volatilización del NH_3 y las

pérdidas mínimas de NO_3^- por lixiviación (NT final (CP1) = 1,61 %; NT final (CP2) = 1,37%; NT final (CP3) = 1,28%).

Por otro lado, en todas las pilas se obtuvieron valores iniciales de la relación COT/NT por debajo del intervalo adecuado para iniciar el proceso de compostaje de forma adecuada (COT/NT = 25-35) (tabla 3). Esto fue debido a que se prentendía compostar la máxima cantidad de estiércol con la proporción de agente estructurante mínima, que proporcionara una aireación y porosidad adecuadas para el intercambio gaseoso óptimo durante el proceso. Respecto a la evolución de este parámetro, se encontró un descenso a lo largo del proceso de compostaje, que indicó la estabilización de la MO de los residuos compostados. En relación, al valor final de la relación COT/NT en todos los compost se obtuvo un valor < 20, lo cual indica un grado aceptable de madurez según los requerimientos para compost de la normativa (Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes). Sin embargo, este valor ya se había alcanzado en las muestras iniciales de estas pilas, con lo cual se tendrán que ver otros parámetros que indiquen que la estabilización de la MO se ha conseguido.

Tabla 3. Propiedades físico-quimicas y químicas de las pilas durante el proceso de compostaje.(I: inicio del proceso; T: fase termófila; FB: final de la fase bio-oxidativa; M: final de la fase de maduración*)*

Parámetros	CP1				CP2				CP3			
	I	T	FB	M	I	T	FB	M	I	T	FB	M
pH	8,34	8,62	8,49	9,70	8,19	9,12	8,46	9,09	9,61	8,37	9,05	9,22
CE (dS/m)	6,76	6,43	10,17	7,60	5,44	7,14	7,74	5,65	6,64	6,51	7,36	7,46
MO (%)	51,7	50,0	34,6	30,2	51,1	42,9	33,5	31,9	53,8	43,5	37,8	29,7
COT (%)	30,0	29,0	20,1	17,5	29,7	24,9	19,4	18,5	31,2	25,2	21,9	17,2
NT (%)	2,57	2,46	2,02	1,61	1,61	1,52	1,83	1,37	1,62	1,52	1,52	1,28
COT/NT	11,67	11,78	9,95	10,88	18,45	16,38	10,62	13,52	19,26	16,61	14,41	13,45

CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; COT: carbono orgánico total; NT: nitrógeno total. CP1:37,6%paja+32,7%gallinaza+29,7% de poda; CP2: 37,6%paja+32,7%estiércol de cabra+29,7% de poda; CP3: 37,6%paja+32,7%estiércol de vaca+29,7% de poda.

En cuanto a la valoración agronómica de los compost obtenidos la tabla 4 se encuentran los resultados de las principales propiedades físico-quimicas, químicas y microbiológicas de los compost obtenidos. En todos los compost, los contenidos de humedad estuvieron por debajo del valor máximo establecido por la normativa para compost (humedad < 40%; Real Decreto 506/2013). El contenido de sales del CP2 fue el más bajos de todos los compost obtenidos. Sin embargo, tanto los valores de pH como de CE fueron altos en todos los compost, siendo estos parámetros los principales limitantes para su uso agrícola. También en todos los compost, el contenido de MO estuvo por debajo del valor mínimo de porcentaje de materia orgánica establecido por la legislación para compost (MO > 35%; Real Decreto 506/2013), estando más cercanos a este valor límite los compost CP1 y CP2. Respecto al contenido de macronutrientes el compost CP1, con gallinaza, fue el que presentó una mayor capacidad fertilizante, ya que sus contenidos de NT, P y K fueron los más altos. Además, los contenidos de metales pesados estuvieron, en general, por debajo de los marcados para clasificar los compost como clase A, excepto en el caso de los contenidos de Ni que fueron en todos los compost mayores que los establecidos para esta clasificación (Ni < 25 mg/kg), así como el compost CP1 presentó valores de Zn por encima de los permitidos para la clasificación A (Zn < 200 mg/kg). Por lo tanto, la clasificación de los compost obtenidos tuvo que ser B. Finalmente, la presencia de microorganismos patógenos estuvo por debajo

de los requerimientos de la normativa para asegurar la higienización de los compost (E. coli < 1000 NMP/g y Samonella = ausente en 25 g de producto; Real Decreto 506/2013). Esto indicó que las temperaturas desarrolladas durante la etapa termófila fueron adecuadas para la reducción de patógenos, contribuyéndose así a la higienización del producto final obtenido.

Tabla 4. *Valores de los principales parámetros físico-químicos, químicos y microbiológicos de los compost obtenidos.*

Parámetros	CP1	CP2	CP3
Humedad (%)	33,90	27,20	16,39
CE (dS/m)	7,60	5,65	7,46
pH	9,70	9,09	9,22
MO (%)	30,2	31,9	29,7
COT (%)	17,5	18,5	17,2
NT (%)	1,61	1,37	1,28
P (%)	1,98	0,79	0,72
K (%)	2,95	1,99	2,58
Cd (mg/kg)	<0,50	<0,50	<0,50
Cu (mg/kg)	53	33	50
Cr (mg/kg)	60	48	82
Hg (mg/kg)	<0,200	<0,200	<0,200
Ni (mg/kg)	49	45	59
Pb (mg/kg)	<2,00	<2,00	<2,00
Cromo (VI) (mg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.
Zn (mg/kg)	312	124	97
E. coli (NMP/g)	< 58	< 58	< 58
Salmonella (presencia)	n.d.	n.d.	n.d.

CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; COT: carbono orgánico total; NT: nitrógeno total. CP1:37,6%paja+32,7%gallinaza+29,7% de poda; CP2: 37,6%paja+32,7%estiércol de cabra+29,7% de poda; CP3: 37,6%paja+32,7%estiércol de vaca+29,7% de poda. n.d.: no detectado. Límite de cuantificación<0,5 mg/kg, en el caso del Cr (VI).

Conclusiones

De los resultados obtenidos, se puede concluir que el co-compostaje de los estiércoles con los residuos vegetales estudiados constituyó un método eficiente, no solo para reciclar estos residuos sino también para obtener compost con un potencial uso en el ciclo productivo agrícola. También, las mezclas de residuos fueron adecuadas con respecto a lograr el aumento de temperatura necesario para asegurar la higienización de los compost obtenidos. Además, la degradación de los residuos fue alta durante el proceso de compostaje con un porcentaje de pérdida de materia orgánica entre 37,6-44,8%, obteniéndose compost con un contenido de materia orgánica por debajo del valor mínimo indicado en la normativa para compost. Esta degradación intensa de la materia orgánica conllevó a la obtención de compost con valores de pH y conductividad eléctrica altos, que son los factores más importantes para la limitación del uso agrícola de los compost finales. El tipo de estiércol empleado influyó

principalmente en la capacidad fertilizante de los compost obtenidos, siendo el compost CP1, elaborado con gallinaza, el que mayor contenido de macronutrientes tuvo. Finalmente, los compost obtenidos se han clasificado como B, respecto a su contenido de metales pesados, no habiendo por ello limitaciones de la cantidad de aplicación de los mismos por hectárea y año.

Bibliografía

Afonso, S., Arrobas, M., Pereira, E.L., Rodrigues, M.A., 2021. Recycling nutrient-rich hop leaves by composting with wheat straw and farmyard manure in suitable mixtures. Journal of Environmental Management. 284, 112105.

Ali, M., Kazmi, A. A., Ahmed, N., 2014. Study on effects of temperature, moisture and pH in degradation and degradation kinetics of aldrin, endosulfan, lindane pesticides during full-scale continuous rotary drum composting. Chemosphere. 102, 68-75.

Bustamante, M. A., Paredes, C., Marhuenda-Egea, F. C., Pérez-Espinosa, A., Bernal, M. P., Moral, R., 2008. Co-composting of distillery wastes with animal manures: Carbon and nitrogen transformations in the evaluation of compost stability. Chemosphere. 72(4), 551-557.

Decreto 49/2000, de 10 de abril, por el que se determinan las masas de agua afectadas por la contaminación de nitratos de origen agrario y se designan las zonas vulnerables por dicha contaminación. Boletín Oficial de Canarias. 48, 4712-4713.

Gavilanes-Terán, I., Jara-Samaniego, J., Idrovo-Novillo, J., Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., 2016. Windrow composting as horticultural waste management strategy–a case study in Ecuador. Waste Management. 48, 127-134.

Ghirardini, A., Grillini, V., Verlicchi, P., 2020. A review of the occurrence of selected micropollutants and microorganisms in different raw and treated manure - Environmental risk due to antibiotics after application to soil. Science of the Total Environment. 707, 136118.

Li, H.Y., Zheng, X.Q., Cao, H.Y., Tan, L., Yang, B., Cheng, W.M., Xu, Y., 2021. Reduction of antibiotic resistance genes under different conditions during composting process of aerobic combined with anaerobic. Bioresource Technology. 325, 124710.

Paredes, C., Roig, A., Bernal, M. P., Sánchez-Monedero, M. A., Cegarra, J., 2000. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. Biology and Fertility of Soils. 32, 222-227.

Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. Boletín Oficial del Estado. 164 (sec I), 51119- 51207.

Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019, por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) nº 1069/2009 y (CE) nº 1107/2009 y se deroga el Reglamento (CE) nº 2003/2003. Diario Oficial de la Unión Europea. L 170, 1- 114.

Reid, K., Schneider, K., McConkey, B., 2018. Components of phosphorus loss from agricultural landscapes, and how to incorporate them into risk assessment tools. Frontier Earth Science. 6, 135.

Romero, C.M., Li, C.L., Owens, J., Ribeiro, G.O., Mcallister, T.A., Okine, E., Hao, X.Y., 2021. Nutrient cycling and greenhouse gas emissions from soil amended with biochar-manure mixtures. Pedosphere. 31, 289-302.

Xie, G., Kong, X., Kang, J., Su, N., Fei, J., Luo, G., 2021. Fungal community succession contributes to product maturity during the co-composting of chicken manure and crop residues. Bioresource Technology. 328, 124845.

Zhongqi, H., Pagliari, P.H., Waldrip, H.M., 2016. Applied and Environmental Chemistry of Animal Manure: A Review. Pedosphere. 26, 779-816.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Aplicación agronómica de los digeridos procedentes de residuos de frutas y verduras

C. Álvarez, M. P. Bernal y R. Clemente

Dpto. Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, Apartado 164, 30100 Murcia. e-mail: calvarez@cebas.csic.es.

Resumen

El problema asociado a la creciente generación de residuos orgánicos y a su inadecuada gestión no solo conlleva una importante pérdida de materiales y energía, sino que también genera un importante impacto medioambiental. Anualmente se genera un importante volumen de residuos de frutas y verduras procedentes tanto de la industria del procesado como de los distintos establecimientos y mercados, muchos de ellos con características y tipología estacional que acentúa la dificultad de su manejo y supone un riesgo ambiental. En este sentido, la digestión anaerobia como método de gestión de este tipo de residuos no solo permite su gestión, evitando el potencial impacto sobre el medioambiente, si no que convierte los residuos en recursos que pueden ser aprovechados por un lado para la generación de una fuente de energía limpia y renovable como es el biogás, y por otro lado en la agricultura, al generar un material digerido con elevados contenidos de nutrientes para los cultivos. Además, desde un punto de vista sostenible, la digestión anaerobia como método de gestión de residuos ayuda a completar el ciclo de economía circular basado en alargar la vida de los productos y reducir la generación de residuos. Sin embargo, para asegurar dicha sostenibilidad y circularidad de la digestión anaerobia, es necesario diseñar estrategias de gestión agronómica del material digerido que garanticen el aprovechamiento de sus nutrientes y materia orgánica en la agricultura. El objetivo principal de este trabajo es la valorización agronómica del digerido obtenido mediante la digestión anaerobia de residuos de frutas y verduras. Para ello, se llevó a cabo la caracterización de los materiales que indican la calidad agronómica de los mismos, la aplicación del material digerido como fertilización de fondo en el cultivo de cardo y maíz, así como la evaluación de los beneficios inducidos en el suelo tras esta aplicación.

Palabras clave: Digestión anaerobia, calidad de digeridos, mineralización, gestión agronómica, residuos.

Agronomical application of digestate from fruit and vegetable residues

Abstract

The problem associated with the growing generation of organic wastes and their inadequate management leads not only to a significant loss of materials and energy, but also to a significant environmental impact. A significant amount of fruit and vegetable waste is generated annually from both the processing industry and shops and markets, many of them have characteristics and seasonal typology that exacerbate their management difficulty and pose an environmental risk. In this sense, the anaerobic digestion is a method for managing these wastes allowing its management, avoiding the potential impact on the environment, and converting waste into resources for the generation of a clean and renewable energy source such as biogas, and in agriculture, by generating a digestate with high nutrient content for crops. Furthermore, from a sustainable point of view, anaerobic digestion as a waste management strategy helps to complete the cycle of circular economy based on extending the life of products and reducing the generation of wastes. However, to ensure such sustainability and circularity of anaerobic digestion, it is necessary to design agronomical management strategies for digested material that ensure the use of its nutrients and organic matter in agriculture. The main objective of this work is the agronomical use of digestate from anaerobic digestion of fruit and vegetable residues. For this, the characterization of the materials that indicate their agronomical quality, their application as a basal fertilization

in the cultivation of cardoon and maize, as well as the assessment of the benefits induced in the soil have been studied.

Keywords: Anaerobic digestion, digestate quality, mineralisation, agronomical management, residues.

Introducción

El tratamiento anaerobio de residuos orgánicos, conocido como digestión anaerobia (DA) o biometanización, es un proceso biológico que ocurre en ausencia de O_2, en el cual la materia orgánica (MO) compleja se descompone, gracias a la acción de un conjunto de reacciones microbiológicas llevadas a cabo por diversos grupos de microorganismos dando como productos finales *biogás* y *digerido* (residuo estabilizado). El *biogás* es un combustible cuyos principales componentes son el metano (CH_4) y el dióxido de carbono (CO_2) generados tras la descomposición de la MO biodegradable aportada por los residuos tratados. El elevado contenido en CH_4 (entre el 50-70%) del biogás, le proporciona una elevada capacidad calorífica, haciendo posible su uso como combustible para la generación de energía, calor o de vehículos. El *digerido* es un subproducto semilíquido que posee generalmente una MO más estable microbiológicamente hablando que los materiales originales, que se produce en volumen similar a los materiales de partida y que conserva sus nutrientes esenciales, transformados a formas inorgánicas y por lo tanto, asimilables por las plantas (Feliu Jofre y Flotats Ripoll, 2020).

Sin embargo, para asegurar la viabilidad del proceso de DA, es necesario realizar una gestión adecuada del material digerido producido, siendo su forma más directa de reciclado la utilización en agricultura para el aprovechamiento de los nutrientes por parte de los cultivos y la mejora de los suelos. En cambio, un uso agrícola inadecuado puede producir riesgo de contaminación del suelo, las plantas y las aguas, y de manera general de todo el ecosistema edáfico. Para evitar estos riesgos, es necesario cumplir una serie de requisitos mínimos que garanticen su calidad agronómica y por ello, la Directiva 2008/98/CE, directiva marco sobre residuos (DMR, 2008), introduce un nuevo procedimiento para definir el *criterio fin de residuo* (End of Waste criteria) que un determinado flujo de residuos debe cumplir para dejar de ser residuos y que en el caso del digerido se basan en: contenido mínimo en MO (15% en peso m.s.), estabilidad mínima (potencial residual de biogás máximo de 0,25 L g^{-1} de Sólidos Volátiles, SV), contenido en patógenos (ausencia de *Salmonella sp*. en 25g de muestra o 1000 UFC/g masa fresca para *E.coli*), máximo de semillas viables (2 semillas viables L^{-1}), máximo de macroelementos extraños (> 2 mm, por el método de tamizado en seco) y contenido limitado de metales pesados y contaminantes orgánicos (Saveyn y Eder, 2014). Por ello, el objetivo principal del trabajo es el estudio de los materiales producidos por DA de restos de frutas y verduras y su valorización agronómica para determinar su capacidad fertilizante. Para ello se llevó a cabo la caracterización de los materiales que indican la calidad agronómica de los mismos, y la aplicación del material digerido como fertilización de fondo en el cultivo de cardo y maíz, así como los beneficios inducidos en el suelo tras esta aplicación.

Material y Métodos

Caracterización y procedencia de los materiales

- **Materiales digeridos**

Los materiales digeridos utilizados en este trabajo provienen de los ensayos de simulación a escala piloto realizados en el Instituto de la Grasa (CSIC), con residuos de diferentes frutas y verduras disponibles en la temporada otoño-invierno (OI) que se tratan de forma individual mediante un tratamiento mecánico para obtener dos tamaños de partículas, 4 mm y 10mm. Los reactores anaerobios

son de tipo CSTR (reactor de tanque agitado continuo), trabajan en régimen semicontinuo (alimentados una vez al día y en continua agitación), bajo condiciones mesofílicas (temperatura entre 35-37°C), tiempo de retención hidráulica (TRH) de 21 días y velocidad de carga orgánica (OLR) de 1g de SV L^{-1} $día^{-1}$. Las muestras de los digeridos se recogieron a los dos tamaños de partícula tras 84 días de funcionamiento del reactor, equivalente a 4 ciclos de retención (D1 y D2; para los digeridos de 4 y 10 mm, respectivamente). Se almacenaron en cámara frigorífica a 4°C para su posterior caracterización química y se tomó una submuestra de cada uno que se procesó sin refrigeración para determinar la estabilidad biológica y la presencia de microorganismos patógenos.

- **Suelos**

Se utilizaron 3 suelos: un suelo agrícola de Cuellar (SI) para el experimento de incubación de C y N, y para el ensayo agronómico 2 suelos agrícolas, S1 de La Pinilla y S2 de La Alberca, ambas en Murcia. Los suelos se caracterizaron respecto a: pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO) carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (NT), capacidad de retención hídrica (CRH) y textura (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los suelos utilizados en los diferentes ensayos.

Parámetro	SI	S1	S2
pH	6,42	7,74	8,1
CE (dS/m)	0,130	0,283	0,854
MO (%)	0,57	1,32	4,92
COT (g/kg)	3,28	7,78	28,93
NT (g/kg)	0,32	1,19	1,30
CRH (%)	19	39	39
Textura	Arenosa	Franca	Franco arcillo arenosa

Diseño experimental

Todos los experimentos se realizaron en las instalaciones del Centro de Edafología y Biología aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) y siguieron el siguiente esquema:

- **Caracterización química y estabilidad de los materiales digeridos**

Para evaluar la calidad de los digeridos, se realizaron diversos análisis químicos: pH, CE, carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (NT), nitrógeno en forma amónica ($N\text{-}NH_4^+$), nitrógeno en forma de nitratos ($N\text{-}NO_3^-$), relación C/N, macronutrientes, micronutrientes, metales pesados y PAH_{16}. Se evaluaron sus condiciones higiénicas determinando *Salmonella sp.*. y *E. coli*, presencia de impurezas físicas (vidrios, metales, plásticos) y grado de estabilidad mediante el potencial de generación de biogás residual. Todos los análisis se realizaron por procedimientos estándar, al menos por duplicado.

- **Ensayo de mineralización de C y N en suelo**

Para estudiar la dinámica del C y N aportado por el digerido en el suelo se realizaron 3 incubaciones en paralelo de 56 días de duración, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (26 ºC y 60 % de CRH).

La incubación de C se realizó en botes herméticos de 500 mL con 40 g de suelo y 3 tratamientos (por triplicado): D1 a 4 mm, D2 a 10 mm y control, añadiendo la cantidad de digerido (1,6 mL) equivalente

a 96 m^3 ha^{-1}. Los suelos control fueron tratados únicamente con agua destilada, y se mantuvieron 3 botes vacíos que actuaban como blancos. El CO_2 desprendido por la mineralización de la MO quedaba retenido en la trampa de NaOH (0,1 M) que se reemplaza cada día de muestreo y se evalúa mediante valoración del exceso de NaOH con HCl en presencia de exceso de $BaCl_2$.

Para evaluar la mineralización del N tras la aplicación de los digeridos se realizaron 2 ensayos de incubación, donde se pesaron 5 g del suelo en tubos "falcon" y se aplicaron 3 tratamientos: D1, D2 y control, siendo la cantidad de digerido aplicada en la primera incubación equivalente a la incubación de C (0,2 mL), mientras en la segunda incubación la dosis fue superior para simular los efectos de una aplicación de digerido en exceso (0,8 mL). La evolución del N-inorgánico en el suelo se determinó en dos extracciones secuenciales de agua destilada y KCl (2M) mediante colorimetría para el $N\text{-}NH_4^+$ y el $N\text{-}NO_3$ se determinó potenciométricamente con electrodo selectivo en el extracto acuoso.

- **Ensayo agronómico de los digeridos en macetas**

Se utilizaron 2 suelos agrícolas (S1 y S2, Tabla 1), 2 cultivos (maíz, *Zea mays L.* y cardo *Cynara carduculus L.*) y 4 tratamientos: control, D1, D2 y fertilización inorgánica, siendo las dosis aplicadas calculadas en función del contenido en NT del digerido y de las necesidades de cada cultivo. El marco de plantación fue de 4 semillas por maceta, se distribuyeron en cámara de cultivo que permite controlar temperatura, humedad y horas de luz, y se realizaron 3 riegos por semana. La duración del ensayo fue de 56 días tras los cuales se recogió la parte aérea de las plantas para determinar peso fresco y seco, mientras los suelos fueron secados al aire y tamizados a 2mm para su posterior análisis.

- **Métodos estadísticos**

Los resultados de los ensayos realizados se evaluaron estadísticamente mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 26 (SPSS inc.) para Windows. Se realizaron análisis descriptivos de los parámetros analizados para conocer su media, máximo, mínimo y desviación típica. Los datos fueron testados para comprobar su normalidad usando el test Shapiro-Wilk y se determinaron ANOVA de un factor y de dos factores y las diferencias entre medias se determinaron mediante un análisis post-hoc usando el test Tukey con un nivel de significación $p<0,05$.

Resultados y Discusión

Características de los materiales digeridos y su calidad

Los resultados del análisis de las muestras recogidas tras 84 días (D1 y D2), así como su grado de cumplimiento de la normativa europea figuran en la Tabla 2. El tamaño de las partículas afectó a los valores de pH y CE del digerido y a la concentración de Cu y B con diferencias significativas pequeñas que no afectan a la calidad final del digerido.

Se observan altos valores de CE, resultado del aumento de las concentraciones de ciertos elementos como K y Na, siendo estos valores acordes a los de otros investigadores en experimentos con digeridos de frutas y verduras (Yagüe y col. 2020). Las concentraciones de nutrientes y elementos potencialmente tóxicos permanecen dentro de los valores aceptados para este tipo de materiales. Sin embargo, el alto contenido en Na de los digeridos hace necesario su control, al tratarse de un elemento que puede provocar efectos tóxicos sobre suelo y planta.

El análisis de microorganismos patógenos indican ausencia de *Salmonella sp*. y niveles de *E.coli* superiores al límite establecido para los criterios higiénicos, lo que indica la necesidad de un postratamiento que garantice su desinfección. La estabilidad biológica del digerido, determinada como

potencial de producción de biogás, obtuvo resultados inferiores a los 0,25 L g^{-1} de SV requeridos como criterio de estabilidad del digerido (Reglamento (UE) 2019/1009) y de acuerdo con los criterios de *fin de residuo* (Saveyn y Eder, 2014). Además, el potencial residual de biometano fue muy bajo (4,8 y 4,4 ml CH_4 g^{-1} SV para D1 y D2 respectivamente), lo que indica la escasa capacidad de producción de CH_4 de estos materiales.

Tabla 2. Resumen de características que definen la calidad de los digeridos según la legislación vigente, los resultados obtenidos por los digeridos estudiados y el cumplimiento de los criterios europeos.

Criterio	Parámetro	Digeridos	Cumple
Contenido en MO	MO	59 - 61	✓
Estabilidad	Potencial residual de biogás	0,078 - 0,084 L/g SV	
Contenido en patógenos	*Salmonella sp.*	Ausencia	
	E. Coli	$7,8x10^3$ - $3,6x10^4$ CFU/g m.f.	✗
Macroelementos extraños	Impurezas	No detectado	✓
Contenido de metales pesados y contaminantes orgánicos (mg/kg peso seco)	Cd	0,3 - 0,8	✓
	Cr	5 – 40	
	Cu	42 – 92	
	Hg	<0,1	
	Ni	4 - 6	
	Pb	13 - 14	
	Zn	117 - 221	
	PAH_{16}	<0,01	
Parámetros declarados (g/kg m.s.)	pH	7,5	😐
	CE (dS/m)	7,16-15	☹
	Nutrientes	N: 73; P_2O_5: 17-31, K_2O: 15-21, MgO: 4-8, S: 4.2-5.8	☺
	N-soluble	$N\text{-}NH_4$: 8,8-14,3 $N\text{-}NO_3$: 1,4-1,8	☺
	Micronutrientes	Acordes	
	NaCl soluble	9,3 - 53,4 g/L	☹
	Materia seca	13 – 17 g/L	😐

Mineralización del carbono

La adición de los digeridos al suelo provocó un rápido aumento en el desprendimiento de $C\text{-}CO_2$ durante los primeros días de incubación (Figura 1 (a) y (b)), relacionado con la presencia en el digerido de MO fácilmente asimilable por los microorganismos, así como una población microbiana activa. La intensa respiración observada durante la primera semana disminuyó con el tiempo de incubación (Figura 1(a)), como consecuencia del consumo de C fácilmente disponible, siendo los valores finales obtenidos por el suelo enmendado muy próximos a los del suelo control. Estos resultados fueron cuantitativamente inferiores a los obtenidos por Alburquerque y col. (2012a) en un

estudio realizado con digeridos de diferentes materiales, lo que se asocia a la baja cantidad de MO presente en el digerido (Tabla 2).

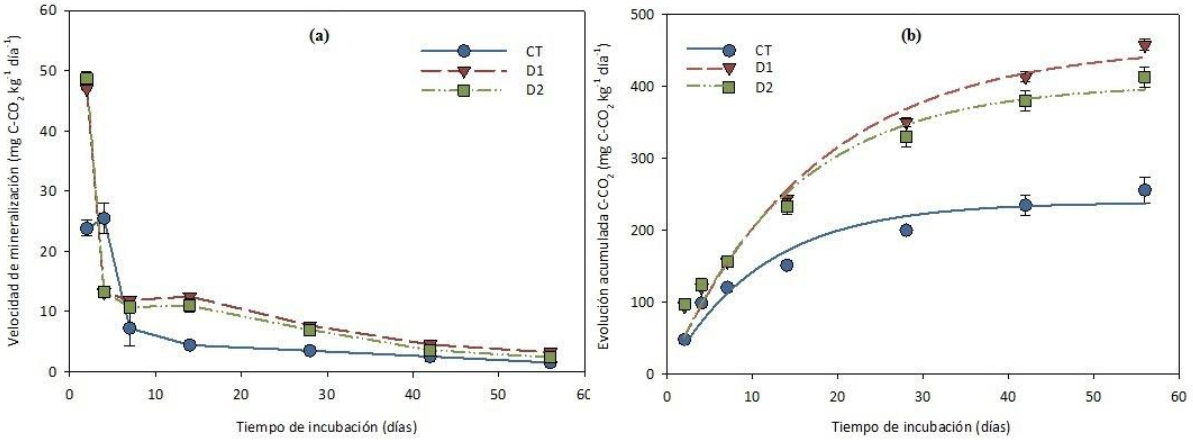


Figura 1. (a) Velocidad de desprendimiento de CO_2 (mg C $g^{-1}día^{-1}$) en los suelos con los tratamientos con D1, D2 y CT. (b) Evolución de la mineralización del C en el suelo (como valor acumulado de C-CO_2 desprendido) en los tratamientos con digerido y control. Los símbolos representan valores experimentales (media ± desv. estándar, n=3) y las líneas corresponden con el ajuste al modelo cinético de primer orden.

Los valores acumulados de mineralización de C muestran diferencias significativas entre los tratamientos con ambos digeridos y control (Figura 1(b)), superando los valores finales de los tratamientos con digeridos (413 y 459 mg C kg^{-1} para los D1 y D2 respectivamente) al control (256 mg C kg^{-1}), siendo estos valores mayores que los obtenidos por De la Fuente y col. (2012) en un experimento de incubación de suelos enmendados con digerido de purín de cerdo. La dinámica de mineralización del C se ajustó a un modelo cinético de primer orden (Bernal y col. 1998) con elevado nivel de probabilidad (p<0,001).

Se calculó el porcentaje de C mineralizado respecto al C añadido mediante los digeridos, el cual superó el 100% al final de la incubación, lo que indica que se produce mineralización parcial de la MO del suelo ("priming effect"), y que los microorganismos tras consumir el C aportado por el digerido comienzan a consumir el C del propio suelo, efecto que se da con frecuencia en suelos enmendados con materiales digeridos escasamente estabilizados (Alburquerque y col., 2012a).

Dinámica del nitrógeno

El aporte al suelo de N en formas disponibles para los cultivos por parte de los digeridos depende de la proporción de N (orgánico e inorgánico) presente en el digerido y de los procesos de mineralización-inmovilización que suceden en el suelo. En ambos procesos de nitrificación e inmovilización se produce una disminución del amonio presente en el suelo, pero durante la nitrificación conlleva un incremento paralelo de la cantidad de nitratos. En la primera incubación (Figura 2 (a)) se observó una dinámica homogénea, sin predominio inicial de ninguna de las formas del N, donde el descenso tenue de la concentración de N-NH_4^+ estuvo acompañado simultáneamente por el incremento de N-NO_3^-. Esto muestra la rápida ocurrencia del proceso de nitrificación, y revela que el proceso de mineralización está controlado por la etapa de amonificación. Tras 56 días de incubación las concentraciones finales de N-NO_3^- alcanzadas por los suelos en los tratamientos D1 y D2 fueron superiores a los valores del control.

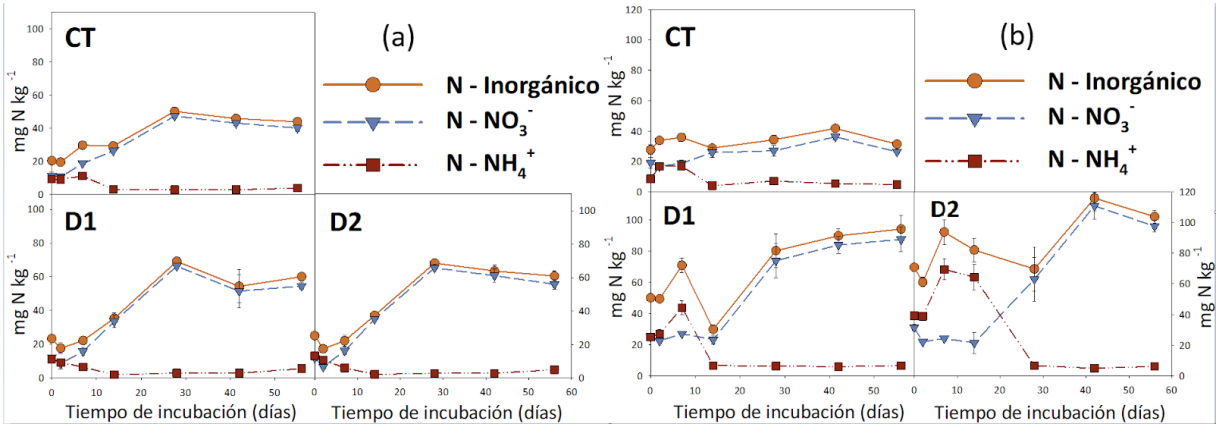


Figura 2. (a) Evolución de las formas inorgánicas de N (N-NH_4, N- NO_3 e inorgánica = amónica + nítrica) en la primera incubación de suelo con digerido D1, D2 y CT. (b) Evolución de las formas inorgánicas en la segunda incubación de suelo con digeridos (valor medio ± desv. estándar, n=3).

En la segunda incubación (Figura 2(b)), donde la cantidad de digerido aplicada fue superior, se observa una dinámica más heterogénea, con predominio inicial de las formas amónicas, mayor en el D2 que en el D1. Se observa un aumento inicial de N-NH_4^+, asociado al proceso de amonificación que se produce al incorporar el digerido al suelo, que disminuye a partir del 7º día, pero en este caso, no fue acompañado por el aumento de N-NO_3^-, sino que la nitrificación resultó retrasada, quizás parcialmente inhibida por la alta concentración de N-NH_4^+ inicial. Bertrand y col. (2007), también observaron ausencia de nitrificación durante los primeros 35 días de incubación de suelos enmendados con residuos de semilla de colza y consideraron una importante inmovilización biológica del NH_4^+. Así la aplicación de dosis bajas de digerido permite conocer la cantidad de N disponible para las plantas (como nitratos) y favorecer el aprovechamiento del N por el cultivo.

Cultivo de maíz y cardo

Los resultados de producción de parte aérea de cardo y maíz (en peso fresco y peso seco), se muestran en la Figura 3 (a) y (b). En el caso del cardo (Figura 3 (a)), únicamente los tratamientos en el suelo S1 muestran diferencias estadísticamente significativas, obteniendo mayor producción de planta el tratamiento con D2. Los resultados obtenidos en la producción de biomasa son acordes a los encontrados por Alburquerque y col. (2012b) donde la adición de digerido al suelo provocó un efecto positivo en el desarrollo del cultivo veraniego de sandía, lo que llevó a recomendar el uso de digerido como fertilizante basal.

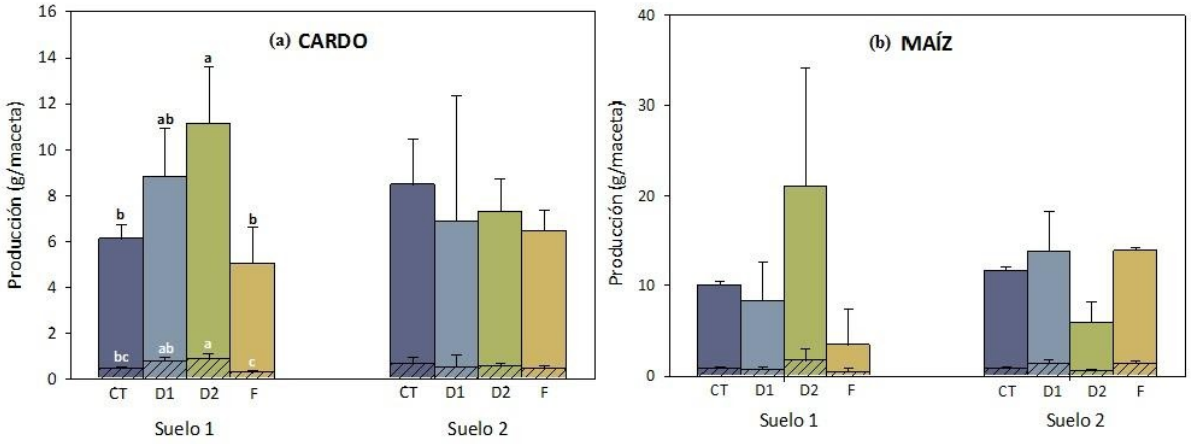


Figura 3. (a) Producción de planta de cardo y (b) producción de planta de maíz en los suelos (S1 y S2) y los tratamientos con digeridos (D1 y D2), fertilizante (F) y control (CT). Barras lisas=peso fresco y barras rayadas=peso seco (valor medio ± desv. estándar, n=3). Barras marcadas con la misma letra no difieren significativamente según el test de Tukey a $p<0,05$.

En el cultivo de maíz, nuevamente el S1 con tratamiento D2 es el tratamiento que mostró mejor resultado de producción de planta, no encontrándose en este caso diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos estudiados en ambos suelos. En cambio, en el S2, es el D2 el que llevó al peor resultado de producción de biomasa, siendo los resultados obtenidos para el D1 y F prácticamente iguales.

Al analizar la composición mineral de las plantas, se observó una disminución en la concentración de N con determinados tratamientos (D1 y D2 en S1 del cardo y D1 en S2 del maíz), que se puede asociar a un efecto de dilución por el mayor crecimiento de las plantas

Las concentraciones de micronutrientes y elementos potencialmente tóxicos se pueden considerar normales en ambos cultivos, se debe prestar especial atención a la concentración de Na en planta (de 0,3-8,1 g kg^{-1} en controles a 8,2-17,3 g kg^{-1} en D1 y D2), que tiende a aumentar con la aplicación del digerido, causando efectos negativos en el caso del maíz al estar este menos adaptado a ambientes salinos que el cardo, cuya respuesta se basa en la acumulación de sales en sus tejidos vegetales. Montemurro y col. (2008) y Alburquerque y col. (2012b) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la utilización de nutrientes en los cultivos de alfalfa y coliflor y sandía, respectivamente.

Efectos sobre suelo

El pH de ambos suelos tras la cosecha de las plantas mostró diferencias significativas entre los tratamientos, aumentando en los tratamientos con digerido (Tabla 3), fenómeno ya observado por Fuchs y col. (2012). En cambio, la CE aumentó en el S1 con el cultivo del cardo, y en el S2 con ambos cultivos, siendo en ambos suelos los mayores valores registrados en el tratamiento con fertilizante inorgánico. Aunque estos valores aumentaron, no se encontraron dificultades en el desarrollo de los cultivos asociados a la salinidad, por lo que el rango obtenido no se puede considerar excesivo o tóxico.

Tabla 3. Efectos de los cultivos y tratamientos sobre los suelos.

Nombre	pH	CE (dS cm^{-1})	NT (g kg^{-1})	N-NO_3^- (mg kg^{-1})	N-NH_4^+ (mg kg^{-1})
Control	7,5-7,8	0,4-0,7	0,7-3,6	47-130	6,2-7,4
D1	7,6-7,9	0,7-1,5	0,9-3,0	49-169	6,4-7,3
D2	7,5-8,1	0,8-1,2	0,8-3,1	35-168	6,1-7,1
Fertilizante	7,3-7,4	1,1-1,6	1,1-3,1	239-298	4,9-7,6

El COT es un parámetro que no resultó afectado por ninguno de los tratamientos estudiados, lo que se asocia a una escasa aportación por el digerido y la rápida degradación de la MO aportada. Alburquerque y col. (2012b) tampoco encontraron diferencias significativas en el COT de un suelo calizo tras la aplicación de digeridos durante dos años consecutivos. El efecto del digerido sobre la MO y el COT del suelo depende de la estabilidad biológica del digerido y por tanto del proceso de mineralización que sucede en el suelo (Alburquerque y col., 2012a). Las concentraciones de NT, N-NO_3^- y N-NH_4^+ mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, siendo nuevamente el tratamiento con fertilizante el que mayores valores obtuvo. En cambio, las concentraciones de P y K disponibles en el suelo fueron superiores en los tratamientos con digeridos, al ser éstos aplicados en función de las necesidades en N del cultivo (Makádi y col., 2012), y a que estos residuos no son materiales equilibrados en la concentración de nutrientes y su concentración depende del origen de los residuos utilizados en la DA.

Conclusiones

El digerido producido a partir de residuos de frutas y verduras tiene una calidad adecuada para su aplicación al suelo y la presencia de nutrientes permitirá la reducción de fertilizantes minerales en la agricultura. Sin embargo, se debe prestar especial atención a la desinfección del digerido y a su concentración salina, que condicionan y pueden limitar tanto la calidad del digerido como su potencial uso agrícola. La alta concentración de N-NH_4^+ en los digeridos puede causar retrasos en el proceso de nitrificación cuando se aplican a elevadas dosis en el suelo, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de realizar una propuesta de fertilización, con la finalidad de evitar efectos perjudiciales tanto en los cultivos como en el medio ambiente.

La aplicación del digerido en los cultivos de maíz y cardo, no causó efectos negativos en el desarrollo de los mismos, lo que pone de manifiesto su posible valorización como fertilizante de cultivos. Ello supone, además de un ahorro económico por sustitución de fertilizantes inorgánicos, un aprovechamiento de subproductos capaces de devolver al mercado un material con valor fertilizante, evitando los impactos ambientales del uso de recursos, aumentando la sostenibilidad de la agricultura y completando el ciclo de economía circular.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó en el marco del proyecto *Employing circular economy approach for OFMSW management within the Mediterranean countries. CEOMED* (Ref.: A_B.4.2_0058),

financiado por la UE en el programa ENI CBC Mediterranean Sea Basin (http://www.enicbcmed.eu/projects/ceomed).

Bibliografía

Alburquerque, J.A., de la Fuente, C., Bernal, M.P. 2012a. Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. Agric. Ecosyst. Environ. 160: 15–22.

Alburquerque, J.A., de la Fuente, C., Campoy, M., Carrasco, L., Nájera, I., Baixauli, F. Caravaca, F., Roldán, A., Cegarra, J., Bernal, M.P. 2012b. Agricultural use of digestate for horticultutal crop production and improvement of soil properties. Eur. J. Agron. 43:119-128.

Bernal, M. P., Paredes, C., Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J. 1998. Maturity and stability parameters of compost prepared with wide range of organic wastes. Bioresour. Technol. 63: 91-99.

Bertrand, I., Delfosse, O., Mary, B. 2007. Carbon and nitrogen mineralization in acid, limed and calcareous agricultural soils: Apparent and actual effects. Soil Biol. Biochem. 39, 276-288.

De la Fuente, C., Alburquerque, J.A., Clemente, R., Bernal, M.P. 2012. Soil C and N mineralisation and agricultural value of the products of an anaerobic digestion system. Biol. Fertil. Soils 49: 313-322.

Directiva 2008/98/CE, 2008. Directiva 2008/98/CE (Directiva Marco de Residuos), del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. Diario Oficial de la UE, L312, p.3.

Feliu Jofre, A., Flotats Ripoll, X. 2020. Renewable gases. An emerging energy vector. Fundación Naturgy, Madrid. https://www.fundacionnaturgy.org/

Fuchs, J.G. Schleiss, K. 2008. Effects of compost and digestate on environment and plant production – Results of two research project. Proceedings of the International Conference ORBIT 2008, Wageningen, 13-16 October 2008.

Makádi, M., Tomócsik, A., Orosz, V. 2012. Digestate: A new nutrient source – Review. In: S. Kumar (Ed.). Biogas. InTech, pp. 295-310.

Montemurro, F., Canali, S., Convertini, G., Ferri, D., Tittarelli, F., Vitti, C. 2008. Anaerobic digestates application on fodder crops: effects on plant and soil. Agrochimica, Vol. LII – N. 5.

Reglamento (UE) 2019/1009. 2019. Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019, por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) n.o 1069/2009 y (CE) n.o 1107/2009 y se deroga el Reglamento (CE) n.o 2003/2003. Diario Oficial de la Unión Europea, L170, p1.

Saveyn, H., Eder, P. 2014. End-of-waste criteria for biodegradable waste subjected to biological treatment (compost & digestate): Technical proposals. European Commission. Joint Research Centre, Institute for Prospective Technological Studies. JRC87124. http://www.jrc.ec.europa.eu

Yagüe, M. R., Lobo, M. C. 2020. Liquid digestate from organic residues as fertilizer: carbon fractions, phytotoxicity and microbiological analysis. Spanish J. Soil Sci. 10: 248-256.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Importancia del manejo de pilas de compostaje en la evolución y calidad del compost en Lliria (Valencia)

O. Medina Benavides, M.T. Fernández Suarez, A. Pérez Espinosa, M.D. Pérez Murcia, R. Moral

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández.
EPS-Orihuela, Ctra. Beniel km 3,2, 03312-Orihuela (Alicante). E-mail: iviss.medina@goumh.umh.es

Resumen

El empleo de residuos ganaderos (estiércol vacuno) junto con restos vegetales (paja), para producir enmiendas de calidad, requieren de ensayos para obtener mejores resultados. Uno de los factores a estudiar son las formas de manejo de las pilas durante el proceso de compostaje. En concreto en este ensayo se han realizado diferentes métodos de volteo de pilas para estudiar su influencia en la calidad del producto final y en la evolución de su perfil térmico, que está íntimamente relacionado con la higienización del compost. Además, en este trabajo también se ha ensayado el uso de compuestos biodinámicos, para estudiar su posible efecto tanto en la evolución del proceso como en el compost final.

El ensayo se realizó en el término municipal de Liria (Valencia) dentro del Convenio de Agro Compostaje de la Generalitat Valenciana. Se establecieron inicialmente tres pilas de compostaje formadas por estiércol vacuno (EV) en las que se realizaron diferentes manejos (SVO: Sin volteo; VVO: Volteo con volteadora; VMO: Volteo con máquina), Cada una de estas tres pilas se dividió a la mitad, obteniéndose tres pilas nuevas a las fueron introducidos preparados biodinámicos en distintos puntos de la pila, obteniéndose al final un total de seis pilas.

En todas ellas se analizaron los parámetros relativos al proceso de compostaje y la evolución de la fracción hidrosoluble, materia orgánica y parámetros indicativos de la calidad final del compost. En general todas las pilas ensayadas cumplieron los requisitos de higienización. No se obtuvieron amplias diferencias entre las pilas control y las pilas biodinámicas y se apreció mejor evolución en las pilas volteadas con máquina.

Palabras clave: estiércol de vacuno, paja, manejo, compostaje, preparados biodinámicos.

Abstract

The use of livestock waste (cattle manure) together with plant remains (straw), to produce quality amendments, requires trials to obtain better results. One of the factors to study are the ways of handling the piles during the composting process. Specifically, in this test, different pile volume methods have been carried out to study their influence on the quality of the final product and on the evolution of its thermal profile, which is closely related to compost sanitation. In addition, in this work the use of biodynamic compounds has also been tested, to study their possible effect both on the evolution of the process and on the final compost.

The test was carried out in the municipality of Liria (Valencia) within the Agro Composting Agreement of the Generalitat Valenciana. Three composting piles made up of bovine manure (EV) were established in which different handling was carried out (SVO: Without turning; VVO: Turning with turning machine; VMO: Turning with machine). Each of these three piles was divided in half. , obtaining three new batteries to those

introduced biodynamic preparations in different points of the battery, obtaining at the end a total of six batteries.

In all of them, the parameters related to the composition process and the evolution of the water-soluble fraction, organic matter and indicative parameters of the final quality of the compost were analyzed. In general, all the batteries tested met the sanitation requirements. No wide differences were obtained between the control piles and the biodynamic piles and a better evolution was observed in the piles turned by machine.

Keywords: cattle manure, straw, management, composting, biodynamic preparations.

Introducción y/o Justificación

El aprovechamiento de los recursos que contienen los residuos ganaderos, tanto la materia orgánica como los nutrientes, requiere la elaboración de planes adecuados de fertilización, basados en los requerimientos de los cultivos y los aportes que puedan realizar estos materiales. El compost o abono compuesto, es el resultado de la descomposición aeróbica de la mezcla de residuos orgánicos, tanto de animales como de vegetales. Es un producto que sirve para mejorar los suelos, ya que aporta nutrientes, promotores de crecimiento y microorganismos benéficos que, entre otras cosas reduce la incidencia de enfermedades y plagas que afectan a las plantas y mantiene una buena calidad del recurso suelo.

La agroecología, como indican Canet y Albiach et al. (2008), es la utilización de los productos orgánicos como productos fertilizantes, tomando la técnica de compostaje como el método más empleado. El método de agricultura biodinámico, partiendo de dos palabras griegas: ¨bios¨ vida y ¨dynamis¨ energía, como explican Reeve et al. (2010), es algo muy diferente a cualquier método de agricultura biológica, ya que representa una vía para la producción de humus.

El compostaje, según, Moreno y Mormeneo et al. (2008), es una compleja interacción entre los restos orgánicos, los microorganismos, la aireación y la producción de calor. Así mismo Epstein et al (1997), señala que las propiedades físicas y químicas de los materiales a compostar influyen sobre el crecimiento de los microorganismos, cuya actividad, a su vez, modifica las propiedades de los sustratos. Existe por tanto una interacción entre cada uno de los factores y elementos influyentes en el proceso.

El papel del compostaje como técnica clave para la gestión de los residuos dentro de la economía circular junto con el empleo de otras formas de gestión de residuos, contribuye a la aplicación y desarrollo de las orientaciones establecidas en el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022 y origina beneficios de carácter, Ambiental, Económico y Social.

En la medida de querer profundizar en el empleo de nuevas estrategias de manejo del proceso de compostaje, este trabajo pretende estudiar el proceso de compostaje de estiércol de vaca con paja, junto con el empleo o no de preparados biodinámicos, combinados a su vez con ensayos de tipos de manejo en la forma del volteo de las pilas, para ver su influencia en las características de los distintos tipos de compost obtenidos.

Material y Métodos

Los materiales utilizados en las pilas de compostaje son: estiércol de ganado bovino con paja, basalto micronizado, preparados biodinámicos, compuestos de arcilla y residuos vegetales. Una vez caracterizados los residuos a compostar, se desarrolló el sistema de pilas de compostaje en las instalaciones de finca Santa Bárbara, ubicada en Lliria (Valencia), donde se controlaron las condiciones de entorno a nivel de aireación, temperatura y humedad.

Para esto, se realizó la preparación de tres pilas de compostaje a base de estiércol de ganado bovino con paja y basalto micronizado. Las pilas de compostaje, tienen una dimensión cada una de 80 metros de longitud, 1,20 metros de ancho y 1,30 metros de alto, con una masa total de materia prima de 25 toneladas cada una.

El control de la aireación se realiza mediante volteos periódicos, en este estudio, una de las pilas no se volteó y en las otras dos se realizaron volteos mecánicos. La temperatura se controla mediante mediciones periódicas tomadas por la persona encargada de realizar la toma de datos. La mezcla se irá calentando, lo que indica que está funcionando bien. Cuando comience a enfriarse se debe voltear.

Durante el proceso de compostaje, se procedió a dividir cada una de las tres pilas, para obtener otras tres pilas nuevas, a las cuales se les incorporó preparados biodinámicos de arcilla con residuos vegetales. De esta manera se establecieron en total seis pilas de compostaje, con tipos de volteo diferente, incorporando a tres de ellas los preparados biodinámicos, con el fin de analizar su influencia en las características de los distintos tipos de compost obtenidos.

Tabla 1. Sistemas de Pilas de Compostaje de la finca Santa Bárbara.

Pila de compostaje.	Composición	Sistema de Pilas
Pilas Orgánicas	Paja Estiércol de Vaca Basalto Micronizado	SVO: Pila Sin Volteo Orgánico.
		VVO: Pila con Volteadora Orgánico.
		VMO: Pila con Volteo con máquina Orgánico.
Pilas Biodinámicas	Paja Estiércol de Vaca Basalto Micronizado Preparados Biodinámicos	SVB: Pila Sin Volteo Biodinámico.
		VVB: Pila con Volteo con Volteadora Biodinámico.
		VMB: Pila con Volteo con máquina Biodinámico.

Las pilas se muestrearon a los 0 días (inicio de compostaje), a los 247 días (final de bioxidativa) y a los 281 días (final de maduración). Las muestras de las pilas de compostaje, se llevaron al laboratorio, para el análisis de los parámetros físicos y químicos iniciales de la materia a compostar.

1. La humedad se determinó por diferencia de peso entre la materia húmeda y la seca una vez secado el material a 105°C., la materia orgánica por pérdida de peso por calcinación a 430 °C, Navarro et al. (1991).

2. El pH, se midió en suspensión acuosa tras agitación mecánica durante 2 horas de la proporción 1:10, (p/V).
3. La conductividad eléctrica, se determina sobre la suspensión acuosa anterior, previamente centrifugada y filtrada, con un conductímetro.
4. La determinación del carbono orgánico total y nitrógeno total se realiza en un analizador elemental C/ N.
5. Los polifenoles solubles, se determinan mediante extracción acuosa en relación 1:20 mediante la modificación del método Folin, descrito por Beltrán et al. (1999).
6. El índice de germinación, se determinó por el método de Zucconi et al. (1981).
7. Los ácidos húmicos, fúlvicos y carbono extraíble, se determinaron tras extracción de la muestra con hidróxido sódico y se determina el carbono extraído en un analizador elemental, según la técnica de Sánchez et al. (2001).

Resultados y Discusión

Perfil térmico

En la figura 1, se muestra el resultado comparativo de los perfiles térmicos, de las 6 pilas de compostaje, mostrando que se encuentran en fase bioxidativa, con una temperatura media superior a 40 °C, correspondiente a fase termófila, superando en más de 10 °C la temperatura del ambiente.

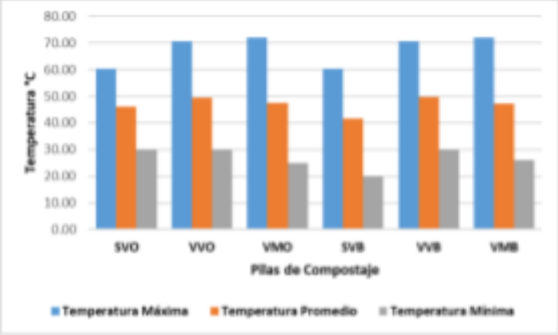


Figura 1. Evolución de la Temperatura.

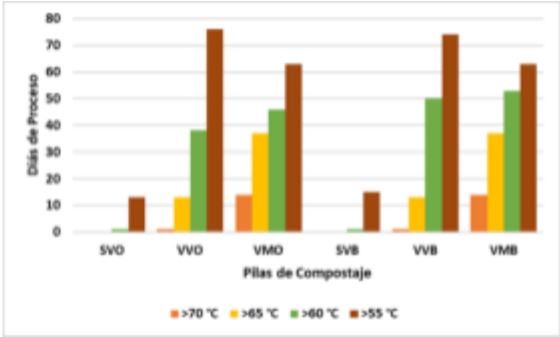


Figura 2. Rango de las Temperaturas.

En la figura 2, las temperaturas máximas promedio, obtenidas durante el proceso corresponden a las pilas VVO (49,5 °C) y VVB (49,7 °C.). Las pilas VVO y VVB, registraron un período más prolongado de 227 días con una temperatura mayor a 50 °C. Además, en todas las pilas, a excepción de SVO, la temperatura se mantuvo por encima de 55 °C, durante el mínimo de 14 días, lo que indica que se cumplieron todos los requisitos de homogeneización establecido por el Reglamento UE 2019/1009.

Fracción hidrosoluble

En la figura 3, se observa que la densidad aparente inicial de las pilas de compostaje es de 0,309 kg/L. En la fase de maduración, se muestra un aumento en la densidad aparente, hasta obtener un rango entre 0,504 kg/L y 0,642 kg/L.

En la figura 4, se muestra que, durante la fase inicial, cada pila registró un 51,4% de humedad, que aumentó hasta 56,9% durante la fase de maduración. Sin embargo, las pilas SVO, VMO y VMB, disminuyeron ligeramente su contenido de humedad a lo largo del proceso entre 45-65%.

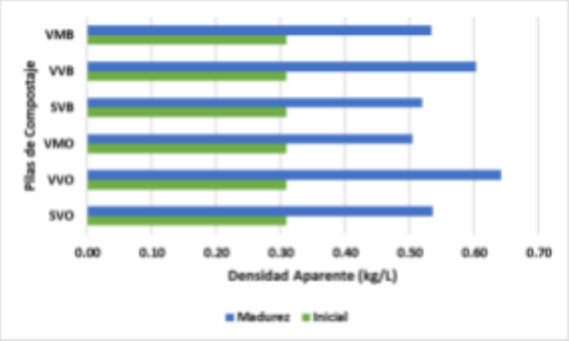


Figura 3. Densidad Aparente.

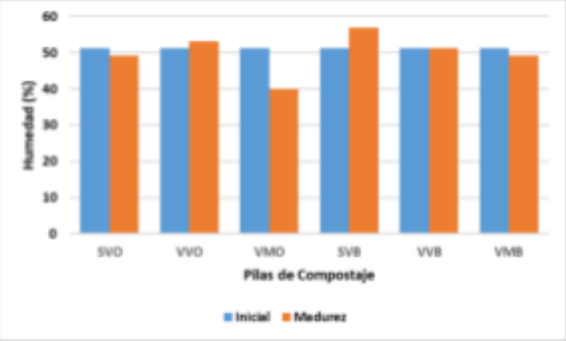


Figura 4. Humedad.

En la figura 5, se plantea que en todas las pilas se produce una disminución del pH entre 8,4 y 7,9, durante la fase bio oxidativa del proceso de compostaje. El pH obtenido en el compost en la fase de maduración de cada una de las pilas se sitúa dentro del rango adecuado (6,0-8,5) para uso agrícola, indicado en Hogg et al. (2002).

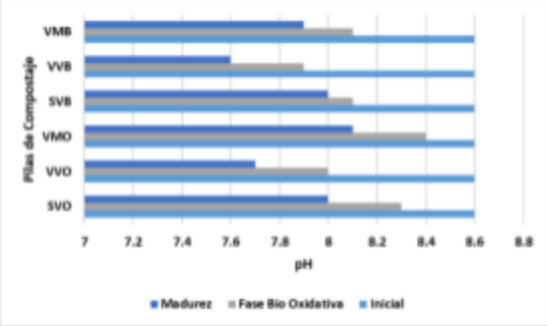


Figura 5. pH.

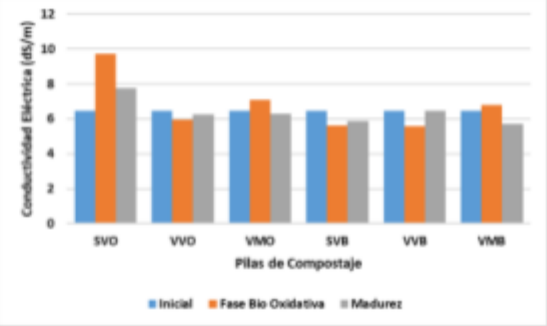


Figura 6. Conductividad eléctrica.

En cuanto a conductividad eléctrica de las pilas de compostaje, en la figura 6, durante la fase inicial, se registró un valor de 6,47 dS/m en cada una de las pilas. En la fase bio oxidativa, aumentó considerablemente a 9,73 dS/m en la pila SVO. Las pilas de compostaje presentaron valores de CE 6,45 dS/m y 5,86 dS/m, en su etapa de maduración.

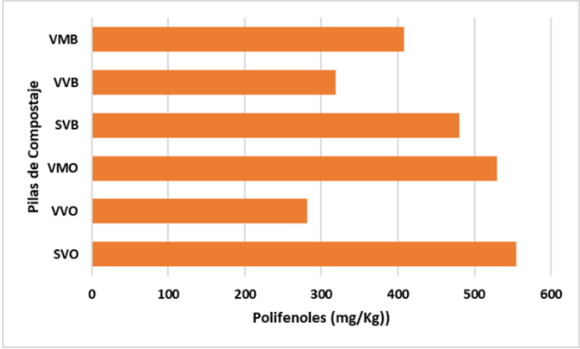


Figura 7. Polifenoles.

En la figura 7, las pilas SVO, VMO y SVB, presentan mayor cantidad de polifenoles que las demás. En cada una de las pilas de compost, los valores finales están dentro del rango de 282 mg kg^{-1} hasta 555 mg kg^{-1} de contenido de polifenoles solubles.

Evolución de la materia orgánica y su fracción sólida

La figura 8, muestra que en la fase inicial todas las pilas registraron 69,5% de materia orgánica total. Durante la fase bio oxidativa, se observa una importante disminución del contenido de materia orgánica en las muestras, respectivamente a valores entre 65,4% y 43,5%.

En la figura 9, muestra los valores de COT registrados en las pilas de compost finales, que se encuentran entre 25,8% y 30,9 %.

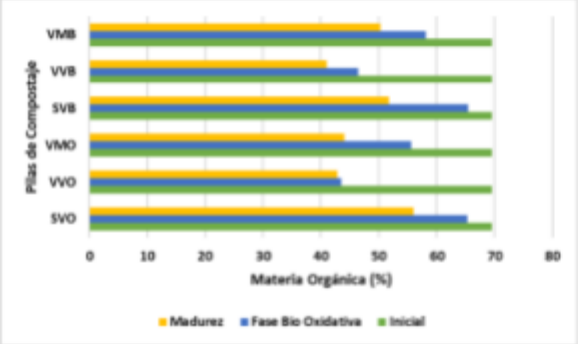


Figura 8. Materia Orgánica.

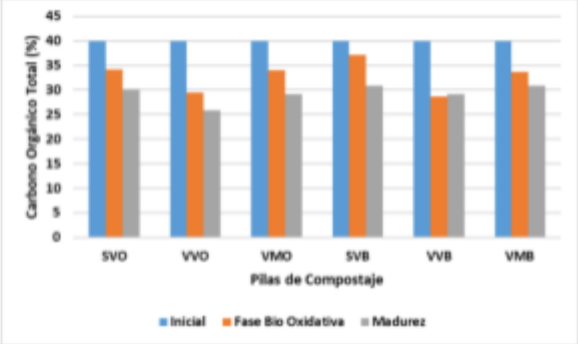


Figura 9. RelaciónC/N.

En la figura 10, los valores de NT, obtenidos en el compost final de cada una de las pilas, se encuentra en torno a 3,5%, dentro del rango de adecuado (0,4 a 3,5 %), propuesto por Dalzell et al. (1991). La evolución de la relación C/N de las pilas de compostaje, se observa en la figura 13, en la fase inicial, se obtuvieron valores de 13,8.

En la figura 11, se observa la relación C/N, durante la fase bio oxidativa, se observó una disminución de este parámetro. Durante la etapa final de maduración, se encuentran entre 8,8 y

9,72, ligeramente por debajo del rango adecuado propuesto por Iglesias y Pérez et al. (1992), que establecen como criterio una relación C/N final de 10 a 20.

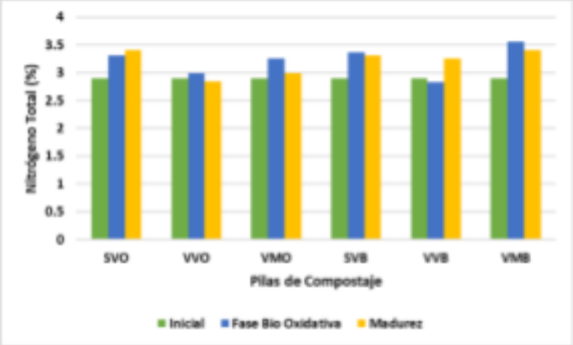


Figura 10. Nitrógeno Total.

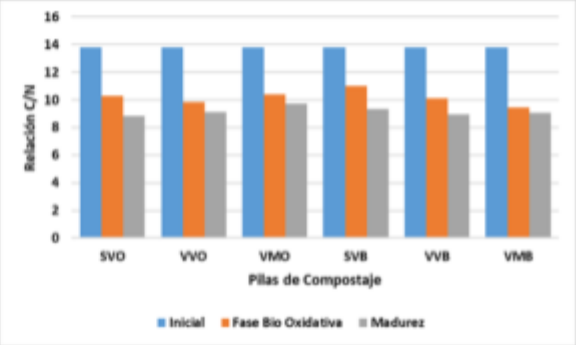


Figura 11. Relación C/N.

Parámetros indicativos de calidad del compost

La figura 12, muestra el análisis de CCC, utilizando como referencia los valores de CCC > 60 meq/MO establecidos por Harada e Inoko (1980). Los valores de capacidad de cambio catiónico, fueron mayores en las pilas SVB, VMO y VVO en comparación con las otras pilas, alcanzando entre 90,5 meq/MO y 125,2 meq/ MO.

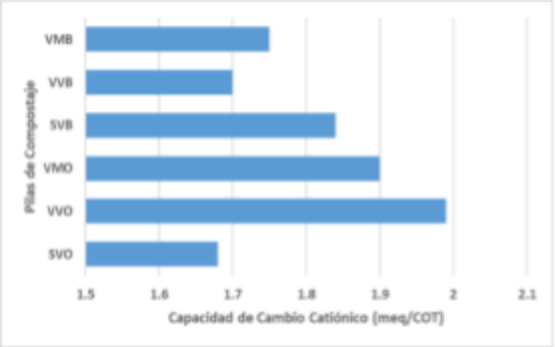


Figura 12. Capacidad de Intercambio Catiónico.

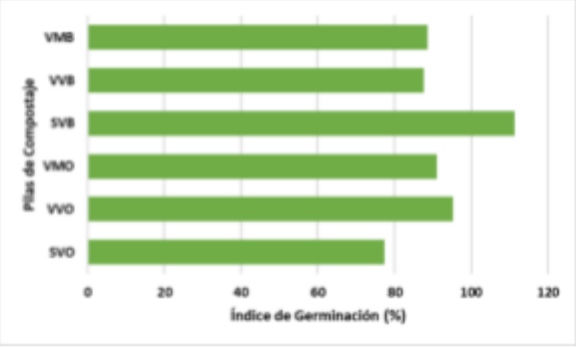


Figura 13. Índice de Germinación.

La figura 13, muestra que todas las pilas de compost obtenidas presentaron valores de IG superiores al 50%, valor mínimo establecido. En el caso del compost SVB, el índice de germinación superó el 100% indicando una capacidad fitoestimulante de este compost.

La figura 14, muestra que la pila SVO, es la que más aporte de ácido fúlvico (1,70%) registró en el proceso de compostaje. Sin embargo, el resto de pilas presentaron valores similares en el rango de 1,03% hasta 1,49%. En la figura 15, se observa que la cantidad de carbono asociado a los ácidos húmicos, en cada una de las pilas, aportaron valores entre 4,40% y 4,55%.

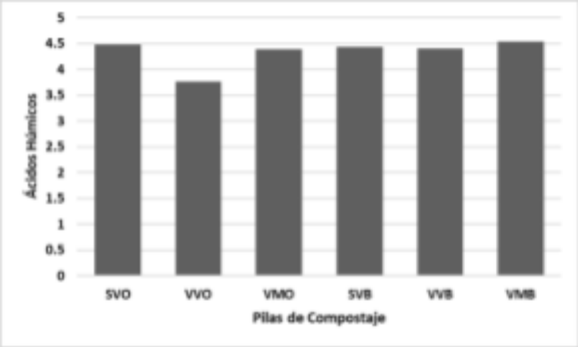


Figura 14. Ácidos Húmicos**.**

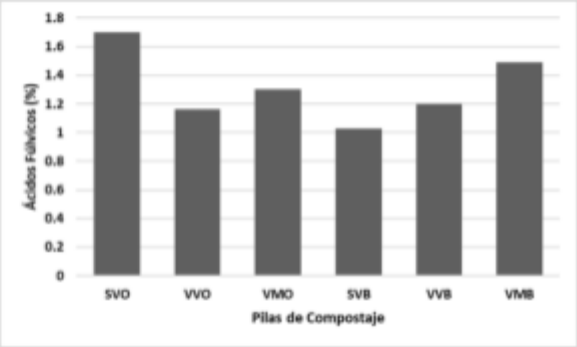


Figura 15. Ácidos Fúlvicos.

Índices de humificación de la materia orgánica

En la figura 17, el sistema de volteos en cada una de las pilas, influyen también en este parámetro de calidad de madurez. Por otro lado, la incorporación de basalto molido biodinámico, únicamente influyó en las pilas con un sistema de volteo activo.

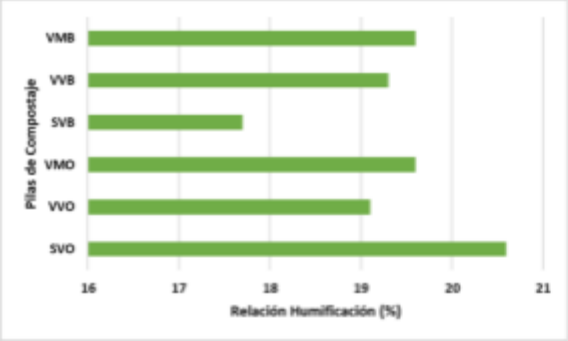


Figura 16. Relación de Humificación.

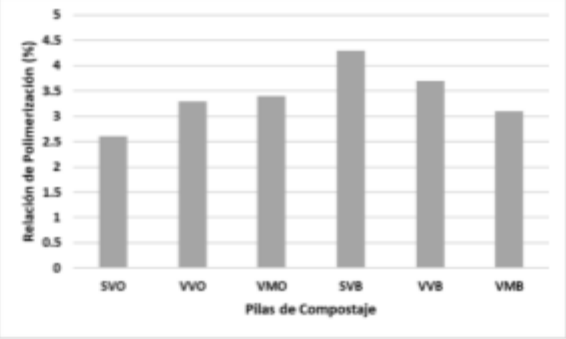


Figura 17. Relación de Polimerización.

En la relación de polimerización, observamos en la figura 19, que la incorporación de basalto molido biodinámico en las pilas de compost SVB y VVB, influye en una relación de polimerización mayor entre 3,7 % y 4,3%.

Conclusiones

Las pilas VVO y VVB, registraron una diferencia de tiempo para la obtención de los criterios térmicos de higienización, superior al obtenido en las demás pilas, lo cual demuestra que el sistema de volteo con volteadora brinda una mayor garantía de higienización frente a los demás sistemas.

En relación con la densidad aparente, todas las pilas mostraron en la fase de maduración, un aumento en la densidad aparente. El contenido de humedad se mantuvo para todas las pilas en el rango óptimo para el buen desarrollo del compostaje. En todas las pilas se produjo una disminución

del pH durante la fase bio oxidativa y de maduración del proceso de compostaje, encontrándose en un rango adecuado para uso agrícola. Los valores de CE finales de todas las pilas son elevados, esperables ya que el estiércol inicial que se empleó como materia prima tiene una CE de 6,5. Los valores de polifenoles en las pilas finales presentan valores normales no llegando a 600 mg/kg en ninguna pila.

En cada una de las pilas, se ha producido un descenso importante de la materia orgánica durante el compostaje, los valores están dentro del rango establecido en la legislación (RD 506/2013), que indica un valor de MO ≥ 35%. Se observa que las pilas con preparados biodinámicos presentan mayor porcentaje de contenido total de carbono orgánico. El nitrógeno total aumenta en general en todas las pilas y especialmente parece incrementarse en las que llevan preparados biodinámicos (3,31 - 3,41 %). Respecto a la C/N en la fase inicial, se obtuvieron valores de 13,8.

La aplicación de basalto molido biodinámico, a las pilas de estiércol vacuno aumentó los valores de carbono total extraíble, asociado a las sustancias húmicas, excepto en la pila sin volteo. El Carbono de los ácidos fúlvicos es mayor en la pila SVO y VMB acorde con los mayores valores de carbono total extraíble. El carbono de los ácidos húmicos es menor en la pila VVO que en el resto. Todas las pilas se encuentran dentro del rango adecuado para su uso agrícola, respecto a la relación de humificación y también respecto al índice de humificación. Este mismo comportamiento se ha observado para la relación de polimerización.

Bibliografía

Adani, F., Genevini, P., Gasperi, F., y Zorzi, G. (1997). Organic Matter Evolution Index (OMEI) as a Measure Of Composting Efficiency. Compost Science y Utilization, 5(2), 53-62.

Bueno, P., Cabrera, F., y Díaz, M. (2008). Factores que afectan al proceso de compostaje. (IRNAS, Ed.) 2(4), 16-570.

Burton, C., y Turner, C. (Enero de 2003). Manure Management: Treatment strategies for sustainable agriculture. Silsoe, 26(2), 451.

Canet, R., y Albiach, R. (2008). Aplicaciones del compost en Agricultura Ecológica. Mundi Prensa, 1(3), 379-396.

Decisión 2000/532/CE, sobre la lista de residuos, de conformidad con la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. (30 de Diciembre de 2014). Boletín Oficial del Estado, 370(44), 44. Obtenido de https://www.boe.es/doue/2014/370/L00044-00086.pdf

Epstein, E. (1997). The Science of Composting. Agricultural Sciences, 6(4), 504.

Escobar, F., Sánchez Ponce, J., y Azero, M. (2012). Evaluación del proceso de compostaje con diferentes tipos de mezclas basadas en la relación C/N y la adición de preparados biodinámicos en la Granja Modelo Pairumani. 5(3), 390-410.

FAO. (2019). Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. El estado mundial de la agricultura y la alimentación., 3(2), 23-47.

Guixot, L. (2018). Compostaje de residuos agrícolas y de jardinería urbana, orientados a la agricultura ecológica, en el ámbito geográfico de Villena. 9-75.

Haug, R. (1993). The Practical Handbook of Compost Engineering. Journal of Agricultural Chemistry and Environment, 4(1), 752-754.

Iannotti, D., Grebus, M., Toth, B., Madden, L., y Hoitink, H. (1994). Oxygen respirometry to assess the stability and maturity of composted municipal solid waste. 1177-1183.

Iglesias, E., y Pérez, V. (1992). Relationships between organic carbon and total organic matter in municipal solid wastes and city refuse composts. Bioresour Technol, 41(3), 265-272.

Iglesias, E., Barral, M., y Marhuenda, F. (2008). Indicadores de estabilidad y madurez del compost. 243-283.

Jiménez, M. (1998). Normas de calidad del compost. Elselvier Publishers.

Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. (2011). Boletín Oficial del Estado, 13046(181), 1983-1984. Obtenido de https://www.boe.es/eli/es/l/2011/07/28/22/con

Moreno, J., y Mormeneo, S. (2008). Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. Mundi Prensa, 111-140.

Moreno, J., Suárez, F., Vargas García, M., López Gozález, J., Jurado, M., y Cervera, O. (2014). Optimización del fraccionamiento de sustancias húmicas en muestras procedentes del compostaje de restos agrícolas. Elselvier Publishers.

Navarro, A., Cegarra, J., Roig, A., y Bernal, M. (1991). An automatic microanalysis method for the determination of organic carbón in wastes. Commun Soil Sci, 22, 2137-2144.

Orden de 3 de diciembre de 2003, de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, por la que se aprueba el Código de Buenas Prácticas Agrarias de la Región de Murcia. (2003). Boletín Oficial de la Región de Murcia, 286(57), 9197-9218. Obtenido de http://www.borm.es/borm/documento?obj=anuyid=363903

Paredes, C., Bernal, M. P., Cegarra, J., y Roig, A. (2002). Bio- degradation of olive mill wastewatersludge by its co-composting whit agricultural wastes. Bioresource Technology, 8(1), 1-8.

Pfeiffer, E. (1992). Introducción al Método Agrícola Biodinámico. 3-14.

Plan Integral de Residuos de la Comunidad Valenciana (PIRCVA) (RD 55/2019). (2019). DOGV Nº 85367 26.04.2019.

Reeve, J., Carpenter Boggs, L., Reganold, J., York, A., y Brinton, W. (2010). Influence of biodynamic preparations on compost development and resultant compost extracts on wheat seedling growth. Bioresource Technology, 101(14), 659-658.

Reglamento 2009/1069/CE. (2009). Boletín Oficial del Estado, 300(1), 300-332. Obtenido de https://www.boe.es/doue/2009/300/L00001-00033.pdf

Reglamento UE 2019/1009 Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. (2019). Boletín Oficial del Estado.

Rynk, R. (1992). On Farm Composting Handbook.

Sánchez, M., Roig, A., Paredes, C., y Bernal, M. (2001). Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. Biores Technol, 78(3), 301-308.

Senesi, N. (1989). Composted materials as organic fertilizers. Composted Material, 81, 521-542.

Theisen, H., y Tchobanoglous, G. (1993). IIntegrated Solid Waste Management: Engineering Principle and Management Issue. McGraw Hill, 5(1), 978.

Tovar Martínez, F. (2013). Determinación de las curvas de temperatura de mezclas de restos de poda de jardinería pública y estiércol de vaca para su compostaje. 40-64.

UNE-EN ISO 11885:2010 Calidad del agua. Determinación de elementos seleccionados por espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (ISO 11885:2007). (2010). Asociación Española de Normalización, 6-31.

Villanueva Reategui, J. (2015). Efecto de las técnicas de elaboración biodinámica y microorganismos eficaces en la calidad del compost en condiciones de la estación experimental agropecuaria. 39-40.

Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., y De Bertoldi, M. (1981). Evaluating toxicity of inmature compost. 22(2), 54-57.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS GENERADOS EN LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO (ECUADOR) PARA EL ESTUDIO DE ALTERNATIVAS A SU GESTIÓN ACTUAL

V.H. Valverde[1], I. Gavilanes-Terán[1], J. Idrovo-Novillo[1], L. Carrera-Beltrán[1], S. Buri Tanguila[1], K. Salazar García[1], C. Paredes[2]

[1] Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. EC060155-Riobamba (Chimborazo), Ecuador y e-mail: victor.valverde@espoch.edu.ec
[2] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3,2, 03312-Orihuela (Alicante)

Resumen

La agricultura y ganadería son sectores con una gran importancia económica y social en Ecuador. La provincia de Chimborazo destaca dentro de estos sectores debido a que el 15% de su superficie está dedicada a cultivos permanentes y transitorios, así como a pastos cultivados. Respecto a la ganadería, en esta provincia se lleva a cabo la crianza de más de 383.000 cabezas de ganado, destacando el ganado vacuno, porcino y ovino. Los residuos generados en estas actividades no son gestionados adecuadamente (residuos vegetales acumulados en terrenos vacíos o incinerados y los estiércoles ganaderos son empleados como enmiendas orgánicas sin un correcto manejo y dosificación), provocándose importantes impactos ambientales. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue llevar a cabo una caracterización de diferentes residuos orgánicos agrícolas y ganaderos generados en la provincia de estudio para evaluar alternativas potenciales a su gestión actual. Para ello, se ha determinado la composición de 24 muestras de residuos procedentes de los cultivos desarrollados en esta provincia, y de 18 muestras de estiércoles de diferentes especies ganaderas. Los parámetros determinados fueron el pH, la conductividad eléctrica (CE), el contenido de materia orgánica (MO), carbono orgánico total (Corg), polifenoles solubles, nitrógeno total (Nt), macro y micronutrientes, metales pesados y aniones solubles y el índice de germinación (IG). Los resultados mostraron que, en general, los residuos analizados tuvieron contenidos notables de macro y micronutrientes y de MO y bajos niveles de metales pesados, siendo estas propiedades positivas para su empleo agrícola. Sin embargo, los altos contenidos de compuestos fitotóxicos y los bajos valores del IG indicaron una falta de estabilidad de la materia orgánica y la necesidad de tratamientos de acondicionamiento de estos residuos antes de su utilización agrícola.

Palabras clave: residuos agrícolas, estiércoles, macro y micronutrientes, metales pesados, compuestos fitotóxicos

CHARACTERIZATION OF AGRICULTURAL AND LIVESTOCK ORGANIC WASTE GENERATED IN THE PROVINCE OF CHIMBORAZO (ECUADOR) FOR THE STUDY OF ALTERNATIVES TO ITS CURRENT MANAGEMENT

Abstract

Agriculture and livestock are sectors with great economic and social importance in Ecuador. The province of Chimborazo stands out within these sectors because 15% of its surface is dedicated to permanent and temporary crops, as well as cultivated pastures. Regarding livestock, in this province more than 383,000 head of cattle are raised, highlighting cattle, pigs and sheep. The wastes generated in these activities are not managed correctly (vegetable wastes are accumulated in empty land or incinerated and livestock manures are used as organic amendments without proper handling and dosage), causing significant environmental impacts. Therefore, the objective of this work was to carry out a characterization of different organic agricultural and livestock wastes generated in the province of study to evaluate potential alternatives to its current management. To do this, the composition of 24 samples of residues from crops grown in this province, and 18 samples of manure from different livestock species has been determined. The parameters determined were pH, electrical conductivity (EC), organic matter content (OM), total organic carbon (Corg), soluble polyphenols, total nitrogen (NT), macro and micronutrients, heavy metals and soluble anions and the germination index (GI). The results showed that, in general, the analyzed residues had notable macro and micronutrient and OM contents and low levels of heavy metals, these properties being positive for their agricultural use. However, the high contents of phytotoxic compounds and the low GI values indicated a lack of stability of the organic matter and the need for conditioning treatments of these residues before their agricultural use.

Keywords: agricultural residues, manures, macro and micronutrients, heavy metals, phytotoxic compounds

Introducción

La agricultura y ganadería son partes dinámicas y vitales de la economía de Ecuador. Su superficie cultivable comprende 12.355.146 ha (INEC, 2017) donde se cultiva una amplia variedad de productos agrícolas como hortalizas, leguminosas y cereales, entre otros. La ganadería en Ecuador comprende la crianza de ganado bovino, porcino, y otras especies como ovejas, caballos y aves (INEC, 2020). La agricultura en Chimborazo aporta el 64,75% de la economía de la provincia (GADP Chimborazo, 2015), con una superficie total de 468.979,92 ha (INEC, 2017), dividida en 10 cantones donde se cultivan productos agrícolas representativos como maíz, cebada, haba, patatas, guisantes, zanahoria entre otros. Sin embargo, la búsqueda de elevados rendimientos económicos a costa de incrementar los ritmos de producción ha causado que en las últimas tres décadas la cantidad de residuos vegetales generados en la región se duplique, produciéndose también cambios en su composición (Gavilanes-Terán, 2014). Además, el uso desmedido y no controlado de fertilizantes y pesticidas de síntesis, junto a prácticas de gestión nulas en los residuos generados, que generalmente son acumulados cerca de explotaciones agrícolas o incinerados, perjudican los sistemas agroalimentarios, impulsando la pérdida de la biodiversidad. Por otra parte, la industria ganadera de la provincia de Chimborazo está liderada por la crianza de ganado bovino (315.000 cabezas de ganado), ovino (126.592 número de cabezas) y porcino (67.487 cabezas de ganado) (INEC, 2020), que son alimentadas a través de técnicas de pastoreo libre, en ocasiones con residuos procedentes de las parcelas de cultivo o con pienso compuesto. Los residuos ganaderos en pocas ocasiones se gestionan de manera adecuada, muchas veces se aplican directamente a las parcelas de cultivo, esta inadecuada disposición contamina los suelos y recursos hídricos cercanos a causa de los contaminantes que

poseen, además de una alta carga de patógenos con amplia resistencia a antibióticos (Onwosi et al., 2017). Como consecuencia de la alta generación y acumulación de residuos vegetales y ganaderos, se originan problemas ambientales en los alrededores de las áreas de producción agrícola como disminución de la fertilidad de los suelos, fenómenos como la eutrofización, generación de gases de efecto invernadero, además de lixiviados, convirtiéndose en una fuente de olores desagradables (Posse et al., 2014). Estos hechos comprometen la seguridad alimentaria de estas cadenas productivas y su adecuado desarrollo. Por estas razones, el objetivo planteado en este trabajo fue caracterizar las fracciones orgánicas de los residuos procedentes de las actividades agrícolas y ganaderas de la provincia de Chimborazo, para obtener información que permita evaluar y plantear potenciales alternativas a su gestión actual, incrementando la calidad de los productos, y en ciertos casos obteniendo productos con características diferentes a las de los materiales de partida y de esta manera promover la sostenibilidad de las industrias agrícola y ganadera de la provincia.

Material y Métodos

El estudio consideró diversos puntos de estudio y muestreos en áreas dedicadas a la actividad agrícola y ganadera en la provincia, se consideraron las zonas de mayor producción agrícola con extensiones cultivables entre 200 a 1.053,48 ha y la disponibilidad de los cultivos según la estación. En el caso de los residuos ganaderos, se consideraron las áreas con mayor producción de especies bovinas de leche y carne, ovinas y porcinas de las parroquias rurales de acuerdo con la base de datos del (GADP Chimborazo, 2015). Se tomaron muestras de residuos en ubicaciones dentro de las comunidades de Batzacón, Calshi, Condor Shamana, Cuatro Esquinas, La Silveria, Pulinguí, Santa Lucía de Chuquipogyo, San Rafael, San Pablo, Sigsipamba, Tuntatacto, y 12 de Octubre.

En esta zona se identificaron y definieron 24 puntos de muestreo correspondientes a residuos de cultivos de diferentes productos agrícolas de la zona, tales como guisantes, cebada, haba, patata, zanahoria y maíz, en este último, los agricultores hacen una distinción entre maíz tierno (cultivado cuando los granos de la mazorca son suaves y húmedos) y maíz o mazorca. Por otra parte, también se recolectaron 18 muestras de residuos ganaderos (estiércol bovino, estiércol bovino alimentado con pienso (estiércol bovino-P), estiércol ovino, estiércol porcino, estiércol equino), todas las muestras se recolectaron por triplicado para su posterior análisis. Las mismas determinaciones analíticas se realizaron tanto en las muestras de residuos de cultivos como en las de residuos ganaderos.

En las muestras se determinó el pH y la conductividad eléctrica (CE) en un extracto acuoso 1:10 (p/v). El contenido de materia orgánica (MO) se calculó según el método de perdidas por ignición a 430 °C establecido por (Navarro,et al., 1993). El contenido de aniones cloruro se realizó mediante una titulación con $AgNO_3$ (Gupta et al., 2012), el contenido de nitratos, sulfatos y fosfatos se determinó en alícuotas de un extracto acuoso 1:10 (p/v). Todas las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro visible, para esto las muestras se mezclaron con kits reactivos específicos según los siguientes métodos: NitraVer 5 (método de reducción de cadmio) (USEPA, 1983a), SulfaVer® 4 (método turbidimétrico) (ASTM, 2002) y PhosVer® 3 (método del ácido ascórbico) (USEPA, 1983b) para las determinaciones de NO_3^-, SO_4^{2-} y PO_4^{3-} respectivamente. Los contenidos de carbono orgánico (Corg) y nitrógeno total (NT) se determinaron en un analizador elemental de combustión directa. El contenido de polifenoles hidrosolubles se determinaron en el extracto acuoso 1:20 (p/v) según el método de Folin-Ciocalteu modificado (Beltrán., 1999). El índice de germinación (IG), se determinó usando semillas de *Lepidium Sativum* L. en extractos acuosos de las muestras según (Zucconi, 1981) para la evaluación de la fitotoxicidad. Los contenidos de K y Na se determinaron mediante un fotómetro de llama, mientras que los contenidos de micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn) y metales pesados (Ni, Cr, Cd, Pb) se analizaron por espectroscopía de absorción atómica.

Los resultados de los análisis de residuos de cultivo y ganaderos se sometieron a un análisis estadístico considerando los tipos de residuo y la cantidad de muestras disponibles. Se calcularon los valores medios de cada parámetro considerando el tipo de residuo, el rango de valores y el coeficiente de variación. Se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), con la finalidad de comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de cada parámetro estudiado para cada tipo de residuo. En el caso en el que la F-ANOVA mostró cierta significancia, se realizó como análisis post-hoc el test de Tukey-b con la finalidad de evaluar las diferencias entre las medias específicas de cada grupo de residuos, mostrándose en los resultados mediante el empleo de letras para una probabilidad del 95% ($P < 0,05$). Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS 22.

Resultados y Discusión

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de residuos de cultivos y residuos ganaderos.

RESIDUO	pH			CE (dS/m)		
	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV
RESIDUOS DE CULTIVOS						
MAÍZ (n=3)	6,76e	6,03-7,40	9	2,01a	1,06-3,03	43
MAÍZ TIERNO (n=2)	6,46de	6,09-6,82	5	2,35a	1,15-3,45	45
GUISANTES (n=3)	5,50ab	5,07-5,88	4	2,91a	2,78-3,05	3
CEBADA (n=3)	6,30cde	5,97-6,58	3	6,21c	2,15-8,19	43
HABA (n=5)	5,86ab	5,47-6,18	3	3,66ab	1,2-4,94	34
PATATA (n=3)	6,08bcd	5,5-6,62	7	6,98c	2,2-10,72	49
ZANAHORIA (N=5)	5,68ab	4,99-6,40	9	3,03a	1,34-7,93	73
F-ANOVA	11,31***			6,67***		
RESIDUOS GANADEROS						
ESTIERCOL BOVINO (n=10)	7,09 ab	6,61-7,50	4	1,18a	0,52-2,17	35
ESTIERCOL BOVINO-P (n=2)	6,89 a	6,68-7,15	2	2,45ab	1,07-3,96	57
ESTIERCOL OVINO (n=2)	7,28bc	7,13-7,44	2	3,43b	1,05-5,75	69
ESTIERCOL PORCINO (n=2)	7,46c	7,37-7,55	1	1,36a	0,91-1,95	28
ESTIERCOL EQUINO (n=2)	7,86d	7,63-7,96	2	5,55c	4,85-6,39	13
F-ANOVA	22,68***			21,02***		

CE: Conductividad eléctrica CV: Coeficiente de variación. ***: significativo a $P < 0,001$. Los valores medios en columnas seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas a $P<0,05$ (test Tukey-b)

La tabla 1 muestra los valores de los parámetros fisicoquímicos de los residuos analizados. Los valores medios de pH muestran que los residuos de cultivos presentan valores entre 5,50 y 6,76, mientras que los residuos ganaderos muestran valores medios ligeramente superiores, entre 6,89 y 7,86. Gavilanes-Terán et al. (2015) también encontraron que los residuos de cultivos hortícolas tales como brócoli y tomate tuvieron valores de pH más bajos que los estiércoles analizados en un estudio sobre la caracterización de residuos agroindustriales generados en la provincia de Chimborazo (Ecuador). Los residuos vegetales contienen gran cantidad de ácidos orgánicos a los que deben su bajo pH, considerándose a estos residuos como fuente de ácidos orgánicos que pueden emplearse en las industrias farmacéutica (con propiedades anticáncer y antimutagénica) y alimentaria (acidulante), así como detergentes/tensioactivos (Sánchez et al., 2021). Sin embargo, los estiércoles contienen gran cantidad de nitrógeno en forma orgánica que primeramente es mineralizado a nitrógeno amoniacal en forma de amonio (NH_4^+) y amoníaco (NH_3) (Chen et al., 2014), siendo esta última forma la que

contribuye al aumento de su pH. En el caso de los residuos de cultivo los más ácidos fueron los residuos de guisantes, zanahoria y haba, mientras que en los residuos ganaderos el estiércol equino mostró el mayor valor de pH, seguidos por el estiércol porcino y ovino. Los valores medios del contenido de sales, medidos mediante la CE, fueron significativamente mayores en los residuos de cultivo de patata y cebada en comparación con los otros residuos de cultivo analizados (CE = 6,98 y 6,21dS/m respectivamente para patata y cebada). En el caso de los residuos ganaderos, el estiércol equino fue el residuo más salino (CE = 5,55 dS/m) en comparación con el resto de los residuos ganaderos analizados. Estos contenidos altos de sales minerales pueden limitar el uso de estos residuos como fertilizantes orgánicos en cultivos y su aplicación directa en suelos.

Tabla 2. Contenido de aniones solubles de residuos de cultivos y residuos ganaderos.

RESIDUOS	Cl^- (g/kg)			NO_3^-(g/kg)			SO_4^{2-}(g/kg)			PO_4^{3-}(g/kg)		
	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV
Residuos de cultivo												
MAÍZ (n=3)	51bc	40 - 62	17	1,7a	1,2-2,6	36	36c	32-42	10	4,1ab	2,4-7,2	58
MAÍZ TIERNO (n=2)	75 c	54 -96	27	2,8ab	1,4-4,2	54	14ab	< 2-32	119	6,8b	< 02-9,2	67
GUISANTES (n=3)	19a	< 3 .28	51	3,8ab	3,2-4,6	13	3ab	< 2-6	113	3,0ab	2,6-3,6	13
CEBADA(n=3)	23ab	20 – 25	9	4,5b	4,0-5,2	11	8ab	< 2-12	78	1,1a	0,2-1,8	65
HABA (n=5)	48bc	< 3 .71	43	3,3ab	<0,1-7, 4	71	1a	< 2-2	110	5,6b	2,4-9,0	43
PATATA (n=3)	49bc	< 3 .65	51	2,9ab	2,0-3,6	23	14ab	< 2-32	103	2,2ab	1,6-3,0	25
ZANAHORIA (n=5)	18a	< 3 – 40	10	4,9b	3,0-6,8	25	16b	< 2-24	40	5,9b	<)2-12,2	70
F-ANOVA	8,68***			4,35**			12,19***			3,79**		
Residuos ganaderos												
ESTIERCOL BOVINO (n=10)	17a	14-20	14	2,5 ab	2,4-2,6	5	13b	< 2-20	68	6,4 a	< 0,02-11, 0	75
ESTIERCOL BOVINO-P (n=2)	15 a	< 3 -20	26	2,8 a	2,2-3,6	15	12b	< 2-20	59	8,1 a	< 0,02-15, 2	39
ESTIERCOL OVINO (n=2)	17 a	17-17	-	3,4 b	3,2-3,6	5	2 a	< 2-4	115	7,6 a	6,6-9,	14
ESTIERCOL PORCINO (n=2)	17 a	14-20	14	2,9 ab	2,6-3,2	9	1 a	< 2-2	115	10,2 a	8,6-11,4	12
ESTIERCOL EQUINO (n=2)	28b	25-31	8	2,5 a	2,2-2,8	10	5ab	2-8	69	20,20 b	17,8-22,8	12
F-ANOVA	13,96***			4,48**			4,74**			14,82***		

CV: Coeficiente de variación. *** y **: significativo a $p < 0,001$ y $p<0,01$, respectivamente. Los valores medios en columnas seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas a $p<0,05$ (test Tukey-b).

Los contenidos medios de aniones solubles se muestran en la tabla 2, estos valores se encontraron en los rangos entre 18-75 g/kg, 1,7-4,9 g/kg, 1-36 g/kg y 1,1-6,8 g/kg para Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-} y PO_4^{3-} respectivamente, en los residuos de cultivos. Los residuos con mayor contenido de cloruros fueron los procedentes de los cultivos de maíz, patata y haba, los residuos de cebada y zanahoria presentaron los contenidos más altos de NO_3^-, el maíz mostró el contenido más alto de SO_4^{2-}, mientras que los mayores contenidos de fosfato se encontraron en los residuos de cultivo de zanahoria, haba y maíz tierno. En el

caso de los residuos ganaderos, los valores de los aniones solubles se encontraron en los rangos entre 15-29 g/kg para Cl^-, siendo el estiércol equino el residuo con el más alto contenido de Cl^-, En el caso de NO_3^- los valores medios estuvieron entre 2,5 y 3,4 g/kg, siendo el estiércol ovino el residuo ganadero con el mayor contenido de NO_3^-. El contenido de SO_4^{2-} se encontró en los rangos entre 1 y 13 g/kg y el estiércol bovino presentó los valores más altos de este anión soluble. El contenido medio de PO_4^{3-} mostró valores entre 6,4 y 20,2 g/kg, siendo el estiércol equino el residuo con mayor concentración de este anión. La mayor parte de los residuos procedentes de cultivos presentaron mayores contenidos medios de aniones solubles que los estiércoles estudiados, excepto en el caso de los fosfatos que fueron sus concentraciones en general mayores en los estiércoles. Por ello, se han hecho estudios para la recuperación de fósforo de los estiércoles, considerándose a estos residuos como fuente importante de este nutriente para plantas (Sobhi et al., 2021). Por otra parte, se encontró una gran dispersión en los datos de los aniones solubles dentro de algunos tipos de residuo, observándose valores del CV mayores del 100 %, debido al amplio rango de variación de valores que fueron desde por debajo del límite de detección hasta valores muy altos.

Los valores medios del contenido de MO fueron similares en todos los residuos de cultivo, con valores entre 63,6-89,9%, mientras que en el caso de los residuos ganaderos los valores estuvieron entre 46,9-70,4 % (Tabla 3). En todos los residuos estudiados, las concentraciones de MO fueron mayores o muy cercanas a los límites establecidos para biorresiduos compostados por las directrices estadounidenses (MO = 50-60% (US Composting Council., 2001). Los residuos procedentes del cultivo de guisantes, cebada, haba y maíz mostraron los mayores contenidos de MO, mientras que los estiércoles bovino y equino fueron los que mayor contenido de MO presentaron de los residuos ganaderos estudiados, probablemente debido a la cama vegetal que contienen estos tipos de estiércoles. Los contenidos medios de Corg en los residuos de cultivos se encontraron entre 20,2 y 44,4% mientras que en los residuos ganaderos estos valores se encontraron en el rango de 23,3-33,1%, no encontrándose diferencias significativas en los contenidos de Corg entre los diferentes tipos de estiércoles analizados.

La relación Corg/NT fue mayor en los residuos de cultivos, encontrándose en el rango entre 6,4 y 42,8, mientras que en los residuos ganaderos estuvo entre 9,7 y 18,5 (Tabla 3). En gran parte de los residuos analizados, la relación Corg/NT estuvo por encima del límite establecido como indicador del grado de estabilización de la materia orgánica (Corg/NT <12) establecido por Bernal et al. (1998). La concentración de polifenoles fue mayor en los residuos de cultivos, con un amplio rango de valores (8,8-23,6 mg/kg), mientras que en los residuos ganaderos el rango estuvo entre 3,0-6,6 mg/kg. Los residuos de cultivos de maíz tierno, guisantes y cebada, y el estiércol ovino mostraron las mayores concentraciones de polifenoles solubles, por lo que la aplicación directa de estos residuos en el suelo causaría daños en plantas y cultivos, debido a una inhibición de su germinación inducida por los polifenoles (Mekki et al., 2007) así como una inmovilización del nitrógeno en el suelo (Bustamante et al., 2008).También se estudió la fitotoxicidad de los residuos, al ser uno de los criterios más importantes para evaluar la idoneidad de los mismos con propósitos agrícolas. El límite establecido por Zucconi et al. (1981) para indicar la ausencia de fitotoxinas es de (IG>50%). Todos los residuos analizados, a excepción del estiércol porcino (IG = 69,2%) se encontraron por debajo de este límite, y la gran mayoría de residuos de cultivos mostraron valores extremadamente bajos de IG (0,0-26,2%), mientras que en el caso de los residuos ganaderos el estiércol ovino presentó el valor más bajo (0,40%). Esto podría explicarse por el gran contenido de polifenoles solubles y aniones solubles observados en estos residuos (Tablas 2 y 3).

Tabla 3. Parámetros químicos y biológicos de los residuos de cultivos y residuos ganaderos.

RESIDUOS	MO (%)			Corg (%)			Corg/NT			Polifenoles (g/kg)			IG (%)		
	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV
Residuos de cultivo															
MAÍZ (n=3)	79,3b	58,7-91,6	16	30,2bc	16,0-42,9	42	42,8b	3,0-130,8	135	8,8 a	2,8-12,1	52	26,2a	0,1-78,4	172
MAÍZ TIERNO (n=2)	85,3b	82,5-86,7	2	40,7d	37,1-44,6	8	18,2ab	15,0-20,3	14	19,6 cd	16,3-22,7	17	0,1a	0-0,1	141
GUISANTES (n=3)	89,9b	87,1-92,5	2	41,8cd	32,5-45,7	12	7,0a	5,3-10,5	27	23,6 d	20,7-25,2	9	0,00a	0-0	-
CEBADA(n=3)	86,5b	85,1-87,4	1	44,4d	43,1-46,3	2	6,4a	4,8-9,7	32	19,1 cd	17,3-21,3	9	0,00a	0-0	-
HABA (n=5)	67,0b	79,5-90,4	4	37,8cd	29,3-44,5	13	7,3a	4,5-13,2	39	15,5 bc	9,8-18,4	20	0,5a	0-1,5	144
PATATA (n=3)	53,6a	46,3-81,5	22	24,1ab	10,4-41,8	54	32,1ab	8,1-95,6	106	10,2 ab	7,6-11,6	19	1,3a	0,0-3,1	125
ZANAHORIA (n=5)	56,0a	55,4-80,6	15	20,2a	15,3-27,0	15	7,4a	2,8-32,7	139	16,0 bc	7,0-24,5	35	0,1a	0-0,4	185
F-ANOVA	11,57***			15,99***			3,18**			11,70***			1,23 NS		
Residuos ganaderos															
ESTIERCOL BOVINO (n=10)	70,4c	67,5-73,2	4	33,1a	31,2-35,7	6	11,6a	11,3-12,1	2	4,5 a	3,9-5,1	13	20,6a	16,7-24,4	26
ESTIERCOL BOVINO-P (n=2)	58,9c	59,4-79,8	8	29,7a	0-42,9	32	9,8a	4,5-15,7	34	2,9 b	1,3-4,5	30	28,1a	11,9-40,5	35
ESTIERCOL OVINO (n=2)	55,3b	53,5-57,5	3	27,2a	20,5-35,8	28	10,3a	6,3-16,6	45	6,6c	5,5-7,9	17	0,4a	0,1-0,7	95
ESTIERCOL PORCINO (n=2)	46,9a	44,1-49,1	4	23,3a	21,3-25,8	8	9,7a	8,4-10,5	8	4,6b	4,1-5,0	8	69,2b	38,3-100	63
ESTIERCOL EQUINO (n=2)	65,8c	64,4-67,5	2	31,7a	29,1-33,8	5	18,5b	16,9-20,1	8	4,2ab	3,9-4,6	7	13,8a	12,7-14,9	11
F-ANOVA	26,45***			1,36 NS			9,81***			19,10***			6,31 **		

MO: Materia orgánica. Corg: Contenido total de carbono orgánico. Corg/NT: Relación carbono-nitrógeno. IG: Índice de germinación. CV: Coeficiente de variación . ***, ** y NS: significativo a $p < 0,001$, $p<0,01$ y No Significativo, respectivamente. Los valores medios en columnas seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas a $p<0,05$ (test Tukey-b).

El contenido total de nitrógeno en los residuos también fue analizado (Tabla 4), el intervalo de valores fue de 1,09-7,51 % y de 1,74-3,38% para residuos de cultivos y residuos ganaderos, respectivamente. Los residuos de cebada, guisantes y haba mostraron los mayores contenidos de NT y en el caso de los residuos ganaderos no se encontraron diferencias significativas en los valores de este nutriente. La concentración media de K en los residuos de cultivo mostró valores en el rango entre 7,64-22,64 g/kg, siendo la cebada, patata y zanahoria los residuos con mayor contenido de este nutriente. Los residuos ganaderos reportaron concentraciones de K entre 5,89 y 35,14 g/kg, siendo mayores los contenidos de este elemento en el estiércol equino comparado con los otros estiércoles estudiados. El K es a menudo es el macronutriente predominante en los residuos de origen vegetal, tal y como han observado otros autores en diferentes estudios de caracterización de residuos vegetales de diferentes cultivos (Gavilanes-Terán et al., 2015; Bustamante et al., 2008). Por otra parte, las concentraciones de Na fueron ligeramente mayores en los residuos ganaderos (2,12-6,35 g/kg) en comparación con los residuos de cultivos (1,07-4,93 g/kg), los residuos de haba, zanahoria, cebada, maíz tierno y patata, así

como los estiércoles porcino y equino, mostraron las concentraciones de Na más elevadas, en comparación con el resto de los residuos de cultivo y estiércoles estudiados.

En las muestras de residuos de cultivos, las concentraciones medias de micronutrientes decrecieron en general en el siguiente orden: Fe > Mn > Zn > Cu. En el caso de los residuos ganaderos el orden decreciente fue el mismo (Tabla 5). En general, los residuos de patata y zanahoria y los estiércoles bovino y porcino mostraron concentraciones más altas de micronutrientes.

Finalmente, los contenidos medios de metales pesados analizados en los residuos estudiados mostraron que el contenido de Ni fue, en general, mayor en los residuos ganaderos en comparación con los residuos de cultivos (Tabla 6). En todos los residuos, los contenidos de Cr y Cd fueron los más bajos de los metales pesados determinados, solo encontrándose trazas de estos metales en algunos residuos de cultivo, tales como los precedentes del cultivo de guisantes, zanahoria y cebada. Es de destacar que los residuos ganaderos no presentaron concentraciones detectables de Cd. El contenido de Pb fue mayor en los residuos de cultivos (5-37mg/kg) en comparación con los residuos ganaderos (0-21 mg/kg). Los residuos de maíz y el estiércol bovino fueron los residuos que mayores concentraciones de Pb tuvieron, dentro de los residuos de cultivo y ganaderos estudiados, respectivamente. Sin embargo, las concentraciones de todos los metales fueron menores que los límites establecidos para la aplicación al suelo de biosólidos por la United States Environmental Protection Agency (2021). Por otro lado, se encontró una gran dispersión en los datos de los contenidos de metales pesados dentro de algunos tipos de residuo, observándose valores del CV mayores del 100 %, debido al amplio rango de variación de valores que fueron desde por debajo del límite de detección hasta valores detectables.

Tabla 4. Contenido de macronutrientes y sodio de los residuos de cultivos y residuos ganaderos.

RESIDUOS	NT(%)			K (g/kg)			Na (g/kg)		
	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV
Residuos de cultivos									
MAÍZ (n=3)	2,99 ab	0,31-5,46	78	7,64 a	5,74-10,98	26	1,11 a	0,9-1,39	14
MAÍZ TIERNO (n=2)	2,32 a	1,94-2,96	19	7,70a	5,51-10,52	29	4,16b	2,81-5,21	28
GUISANTES (n=3)	6,44cd	3,09-8,21	30	7,93 a	5,80-10,0	18	1,07 a	0,846-1,20	11
CEBADA(n=3)	7,51d	4,65-9,22	25	22,64c	23,50-27,39	5	4,49b	4,00-4,79	7
HABA (n=5)	5,63cd	3,05-7,15	23	17,48b	12,97-25,10	20	4,93b	3,61-7,55	22
PATATA (n=3)	1,09 a	0,44-1,66	38	22,46bc	18,60-27,00	13	4,19b	2,98-5,20	20
ZANAHORIA (n=5)	5,07 bc	0,7-6,87	39	20,88bc	8,00-30,38	39	4,85b	2,81,-5,99	25
F-ANOVA	13,19***			18,62***			24,49***		
Residuos ganaderos									
ESTIERCOL BOVINO (n=10)	3,38a	0-7,29	51	6,83a	2,35-13,41	44	2,12a	1,05-3,45	34
ESTIERCOL BOVINO-P (n=2)	2,85a	2,66-3,17	7	8,22a	6,75-9,98	18	2,28a	2,00-2,59	12
ESTIERCOL OVINO (n=2)	2,80a	2,16-3,37	18	21,63b	16,57 -24,50	17	4,65b	3,59-6,30	28
ESTIERCOL PORCINO (n=2)	2,40a	2,25-2,6	6	5,89a	5,49-6,20	6	5,79bc	4,69-7,20	19
ESTIERCOL EQUINO (n=2)	1,74a	1,6-1,87	6	35,14c	34,43-36,00	2	6,35c	6,21-6,41	1
F-ANOVA	1,86 NS			114,54***			42,17***		

NT: Nitrógeno total. *** y NS: significativo a $p < 0,001$ y No Significativo, respectivamente. Los valores medios en columnas seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas a $p<0,05$ (test Tukey-b).

Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron de manera general que los residuos estudiados presentaron valores de pH cercanos a la neutralidad, siendo estos valores ligeramente superiores en los residuos ganaderos en comparación con los residuos de cultivo. La mayor parte de los residuos caracterizados mostraron valores bajos de CE (CE < 3 dS/m) y altos contenidos de materia orgánica. Los contenidos de aniones y polifenoles solubles fueron más altos en los residuos de cultivos, excepto el contenido de fosfatos que fueron mayores en los residuos ganaderos, esto explicó los bajos valores del IG de estos residuos, indicando la presencia de compuestos fitotóxicos. En general, las concentraciones de macronutrientes, micronutrientes y metales pesados fueron mayores en los residuos ganaderos que en los residuos de cultivos. En todos los residuos, los niveles de elementos potencialmente tóxicos se encontraron por debajo de los límites establecidos en las directrices estadounidenses para su uso como enmiendas orgánicas. En gran parte de los residuos analizados se encontró que la relación Corg/NT estuvo por encima del límite establecido como indicador del grado de estabilización de la materia orgánica, lo que indicó su falta de estabilidad. Los resultados obtenidos muestran que los residuos analizados podrían potencialmente emplearse en la agricultura, pero sería necesario emplear tratamientos específicos como el compostaje, que estabilizaran la materia orgánica de estos residuos y eliminara su fitotoxicidad, permitiendo así su utilización y valorización agrícola y promoviendo la sostenibilidad del sector agropecuario

Tabla 5. Contenido de micronutrientes de los residuos de cultivos y residuos ganaderos.

RESIDUOS	Fe (mg/Kg)			Cu (mg/Kg)			Mn (mg/Kg)			Zn (mg/Kg)		
	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV
Residuos de cultivos												
MAÍZ (n=3)	2829ab	650-6190	85	12 ab	6-16	33	63ab	21-93	51	42ab	33-50	13
MAÍZ TIERNO (n=2)	705a	648-778	8	11 ab	10-13	15	26a	22-28	12	47abc	36-59	22
GUISANTES (n=3)	857a	671-1045	16	6 a	3-10	42	32a	27-36	10	48abc	44-54	8
CEBADA(n=3)	803 a	643-906	12	9 ab	8-9	6	26ab	24-28	7	35a	31-40	10
HABA (n=5)	1603a	1089-2616	34	13b	11-15	13	104c	30-201	59	54bc	36-82	25
PATATA (n=3)	4652b	1529-7219	53	22c	11-33	44	130c	122-141	5	74d	58-85	14
ZANAHORIA (n=5)	3037ab	1276-8253	85	14b	12-17	15	79abc	44-129	42	59c	48-76	17
F-ANOVA	4,51**			9,27***			8,63***			11,06***		
Residuos ganaderos												
ESTIERCOL BOVINO (n=10)	2041a	1092-2531	21	33b	27-45	15	322b	77-524	39	144b	100-224	22
ESTIERCOL BOVINO-P (n=2)	2106a	2040-2243	5	35b	31-38	8	252ab	208-287	17	131ab	125-137	4
ESTIERCOL OVINO (n=2)	2553a	2113-2714	12	22a	20-24	7	154a	152-158	2	93ab	88-95	4
ESTIERCOL PORCINO (n=2)	6612b	6060-7008	6	28ab	25-30	8	147ab	139-150	4	116ab	106-123	7
ESTIERCOL EQUINO (n=2)	2027a	1906-2145	5	22a	21-22	2	127ab	124-131	3	102a	97-107	4
F-ANOVA	130,42 ***			13,17***			6,28***			5,59**		

***, **: significativo a $p < 0.001$ y $p<0.01$ respectivamente. Los valores medios en columnas seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas a $p<0,05$ (test Tukey-b).

Tabla 6. Contenido de metales pesados de los residuos de cultivos y residuos ganaderos.

RESIDUOS	Ni (mg/Kg)			Cr (mg/Kg)			Cd (mg/Kg)			Pb (mg/Kg)		
	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV	Media	Rango	CV
Residuos de cultivos												
MAÍZ (n=3)	2,91 ab	1-6,67	93	< 0,1a	< 0,1 -0,2	167	< 0,1a	< 0,1	-	36,45c	30,79-39 ,72	9
MAÍZ TIERNO (n=2)	< 0,1a	< 0,1	-	< 0,1a	< 0,1	-	< 0,1a	< 0,1	-	32,62b c	26,85-40 ,48	21
GUISANTES (n=3)	0,75 a	< 0,1-1,4 9	83	1,60 a	< 0,1-5	155	0,53b	0,4-0,6	22	10,99a bc	9,4-12,7	12
CEBADA(n=3)	1,80 a	< 0,1-5	120	< 0,1a	< 0,1	-	0,40b	< 0,1-0,7	90	15,78a b	11,98-19 ,1	20
HABA (n=5)	2,39 a	< 0,1-4,7	88	< 0,1a	< 0,1	-	< 0,1a	< 0,1	-	17,26a bc	< 0,1-47,0 1	24
PATATA (n=3)	3,78 ab	< 0,1-6,2	78	< 0,1 a	< 0,1	-	< 0,1a	< 0,1	-	25,45a bc	< 0,1-42	79
ZANAHORIA (n=5)	7,58b	< 0,1-14, 5	70	3,49 a	< 0,1-9,9 8	115	< 0,1a	< 0,1	-	5,25a	< 0,1-14,7 3	130
F-ANOVA	4,99** **			3,70**			9,95** *			5,18** *		
Residuos ganaderos												
ESTIERCOL BOVINO (n=10)	2,91 a	< 0,1-6,5 6	85	< 0,1a	< 0,1	-	< 0,1a	< 0,1	-	21,14b	7,19-40, 59	48
ESTIERCOL BOVINO-P (n=2)	4,94 a	<0,1-9, 98	113	< 0,1a	< 0,1	-	< 0,1a	< 0,1	-	14,70a b	13-16,57	10
ESTIERCOL OVINO (n=2)	10,99 c	7,58-14 ,77	35	< 0,1b	< 0,1	116	< 0,1a	< 0,1	-	12, 81ab	6,4-20,1	54
ESTIERCOL PORCINO (n=2)	10,21 bc	8,8-11, 8	13	0,14c	0,13-0, 17	12	< 0,1a	< 0,1	-	0, 52 a	< 0,1-1,1	116
ESTIERCOL EQUINO (n=2)	5,60 ab	4,5-6,3 1	14	< 0,1b	< 0,1	16	< 0,1a	< 0,1	-	< 0,1a	< 0,1	-
F-ANOVA	9,99** **			68,66** **			0,00 -			9,15** *		

***, **: significativo a $p < 0.001$ y $p<0.01$ respectivamente. Los valores medios en columnas seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas a $p<0,05$ (test Tukey-b).

Agradecimientos

Este trabajo de investigación forma parte del proyecto de investigación titulado: Diseño, automatización y validación de un sistema de recuperación de energía calórica en el proceso de compostaje, ejecutándose entre el GAIBAQ (Grupo Asociado de Investigación en Biotecnología Ambiente y Química) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y el GIAAMA (Grupo de Investigación Ambiental de Agroquímica y Medio Ambiente) de la Universidad Miguel Hernández de Elche, por lo que los autores agradecen su contribución científica y financiación.

Bibliografía

ASTM D516-02, Standard Test Methods for Sulfate Ion in Water. 2002. ASTM International, West Conshohocken. https://www.astm.org/Standards/D516.htm

Beltrán, F. J., García-Araya, J. F., y Álvarez, P. M. 1999. Wine distillery wastewater degradation. 1. Oxidative treatment using ozone and its effect on the wastewater biodegradability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(9), 3911–3918. https://doi.org/10.1021/jf981262b

Bernal, M. P., Paredes, C., Sanchez-Monedero, M. A., & Cegarra, J. 1998. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. Bioresource Technology, 63(1), 91–99. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00084-9

Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. D.2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. Waste Management 28(2), 372-380. https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2007.01.013

Chen, L., Xing, L., Han, L.2014. Review of the Application of Near-Infrared Spectroscopy Technology to Determine the Chemical Composition of Animal Manure. Journal of Environmental Quality 42(4), 1015-1028. https://doi.org/10.2134/jeq2013.01.0014

GADP Chimborazo, 2015. Plan de desarrollo y de ordenamiento territorial de Chimborazo 2015. http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/0660000280001_Actualización del Proceso del PDyOT_14-08-2015_16-43-38.pdf (Acceso 15 julio 2021).

[dataset] Gavilanes-Terán, I.2014. Oportunidades y desafios de la gestion de residuos orgánicos procedentes del sector agroindustrial en América del Sur: Provincia de Chimborazo (Ecuador) [UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ]. http://hdl.handle.net/11000/2002

Gavilanes-Terán, I., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Ángeles Bustamante, M., Gálvez-Sola, L., & Jara-Samaniego, J. 2015. Opportunities and Challenges of Organic Waste Management from the Agroindustrial Sector in South America: Chimborazo Province Case Study. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 46, 137–156. https://doi.org/10.1080/00103624.2014.988584

Gupta, I. C., Yaduvanshi, N. P. S., & Gupta, S. K. 2012. Standard methods for analysis of soil, plant and water. Scientific Publishers, New Delhi.

[dataset] INEC. 2017. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/datos/Estadisticas_Agropecuarias/ESPAC/spss/bdd_espac_2017_SPSS.zip

[dataset] INEC. 2020. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua- ESPAC 2020. Información Estadísitica-Tabulados https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/

Mekki, A., Dhouib, A., & Sayadi, S. 2007. Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. Journal of Environmental Management, 84 (2), 134-140. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.05.015

Navarro, A. F., Cegarra, J., Roig, A., & Garcia, D. 1993. Relationships between organic matter and carbon contents of organic wastes. Bioresource Technology, 44(3), 203-207. https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90153-3

Onwosi, C. O., Igbokwe, V. C., Odimba, J. N., Eke, I. E., Nwankwoala, M. O., Iroh, I. N., Ezeogu, L. I. 2017. Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. Journal of Environmental Management.190, 140-157. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.051

Posse, G., Lewczuk, N., & Richter, K. 2014. Sustentabilidad y las emisiones de carbono en la agricultura argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina

Sánchez, M., Laca, A., Laca, A., y Díaz, M. 2021. Value-Added Products from Fruit and Vegetable Wastes: A Review. Clean - Soil, Air, Water, 49(8), 1–21. https://doi.org/10.1002/clen.202000376

Sobhi, M., Gaballah, M. S., Han, T., Cui, X., Li, B., Sun, H., Guo, J., & Dong, R. 2021. Nutrients recovery from fresh liquid manure through an airlift reactor to mitigate the greenhouse gas emissions of open anaerobic lagoons. Journal of Environmental Management, 294. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112956

[dataset] United States Environmental Protection Agency. 2021. Regulatory Determinations for Pollutants in Biosolids. https://www.epa.gov/biosolids/regulatory-determinations-pollutants-biosolids

[dataset] US Composting Council. 2001. Field guide to compost use. http://compostingcouncil.org/admin/wp-content/plugins/wp-pdfupload/pdf/1330/Field_Guide_to_Compost_Use.pdf

USEPA 600/4−79−020 Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes.1983a. Method 353.2 (Colorimetric, Automated, Cadmium Reduction). United States Environmental Protection Agency. Cincinnati

USEPA 600/4−79−020 Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. 1983b. Method 365.1 (Colorimetric, Automated, Ascorbic Acid) United States Environmental Protection Agency. Cincinnati

Zucconi, F. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. Biocycle, 22(2), 54–57. https://ci.nii.ac.jp/naid/80000942814/#cit

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Combined effect on substrate, plastic biofilm and earthworms (*Eisenia fetida*) in presence of different type of plastic material under vermicomposting

Zbigniew Emil. Blesa [1], Marcela. Pedraza-Torres [2], J.A. Sáez [1], J.C. Sánchez-Hernández [2 y] R. Moral[1]

[1] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, Carretera Beniel km3,2, Orihuela, Alicante 03312, España. zblesa@umh.es
[2] Laboratorio de Ecotoxicología, Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Toledo, España

Resumen

El uso de plásticos en sistemas de agricultura intensiva contribuye a la generación y acumulación de residuos plásticos en los suelos con efectos negativos sobre el medio ambiente. Actualmente, el 31% de los residuos plásticos terminan en vertederos y el 39% se incinera. Esto urge la necesidad de desarrollar estrategias biotecnológicas que hagan frente a este desafío. El vermicompostaje es una técnica exitosa en la biotransformación de residuos orgánicos y puede proporcionar una solución complementaria para la biodegradación de materiales residuales plásticos. El objetivo principal de este TFM ha sido la evaluación comparativa a nivel de microcosmo del efecto de la presencia de diferentes tipos de plástico (LLDPE, LDPE y EPS) de uso agrario, en una comunidad de lombrices de tierra (*Eisenia fetida*) durante el proceso de vermicompostaje. El diseño experimental consistió en la incubación en condiciones controladas (20ºC ± 2 en oscuridad) utilizando cajas Petri (ø15 cm) de (n=50) individuos citelados con material plástico en proporción (1.25 % p/p, tamaño partícula 1x1 cm) en 80 g de sustrato obtenido de una pila comercial de compostaje. Adicionalmente, se realizaron dos controles, el primero contenía la mezcla de sustrato y plástico sin agregar lombrices y el segundo control, contenía solo sustrato inoculado con lombrices sin agregar plástico. Las placas se analizaron a los 45 días y se examinó el estado de salud de *E. fetida* a través de la medida de los principales biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo y la potencial actividad enzimática generada en el sustrato y biopelícula plástica inducida por la actividad de las lombrices. Se observó un descenso significativo ($p<0.005$) del peso corporal de *E.fetida* en todos los tratamientos con una tendencia constante durante el estudio. La dosis de plástico añadido al sustrato no fue tóxica para la lombriz. Se evidenciaron signos de estrés oxidativo (concretamente en la peroxidación lipídica), pero no hubo diferencias significativas en los demás biomarcadores. Existen diferencias significativas de la actividad deshidrogenasa, catalasa y carboxilesterasa entre el sustrato y el sustrato pegado a los plásticos o biofilm. Estás diferencias señalan que las lombrices son capaces de expresar exoenzimas potencialmente biodegradadoras del plástico, como son las catalasas e indirectamente la carboxilesterasa, enzima implicada en el metabolismo de detoxificación de xenóbioticos como sustancias endógenas (en nuestro caso plásticos). Estos resultados preliminares sugieren que los plásticos actúan como biofilms que sirven de soporte de los microrganismos y exoenzimas detoxificantes que las lombrices estimulan con su actividad, resultando así en una posible estrategia complementaria de biorremediación in situ donde la interacción de las lombrices de tierra con los plásticos en el suelo juega un papel potencial bioestimulante. En cuanto a las características físico-químicas del sustrato, de los diferentes parámetros medidos, se puede afirmar que no alteran de forma significativa la capacidad degradativa de las lombrices.

Palabras clave: *Eisenia fetida*, Vermicompostaje, ecotoxicología, lombrices de tierra y plástico.

Combined effect on substrate, plastic biofilm and earthworms (*E. fetida*) in presence of different type of plastic material under vermicomposting conditions

Abstract

The use of plastics in intensive agriculture systems contributes to the generation and accumulation of plastic waste in soils with negative effects on the environment. Currently, 31% of plastic waste ends up in landfills and 39% is incinerated. This point out the need to develop biotechnology strategies to meet this challenge. Vermicomposting is a successful technique in the biotransformation of organic waste and can provide a complementary solution for the biodegradation of plastic waste materials. The main objective of this TFM has been the comparative evaluation at the microcosm level of the effect of the presence of different types of plastic (LLDPE, LDPE and EPS) for agricultural use, in a community of earthworms (Eisenia fetida) during the process of vermicomposting. The experimental design consisted of incubation under controlled conditions (20ºC ± 2 in darkness) using Petri dishes (ø15 cm) of (n = 50) individuals citellatedd with plastic material in proportion (1.25% w / w, particle size 1x1 cm) in 80 g of substrate obtained from a commercial composting pile. Additionally, two controls were carried out, the first one contained the mixture of substrate and plastic without adding worms and the second control, contained only substrate inoculated with worms without adding plastic. The substrate were analyzed at 45 days and the health status of E. fetida was examined through the measurement of the main biomarkers related to oxidative stress and the potential enzymatic activity generated in the substrate and plastic biofilm induced by the activity of worms. A significant decrease (p <0.005) in Eisenia body weight was observed in all treatments with a constant trend during the study. The dose of plastic added to the substrate was not toxic to the worm. Nevertheles signs of oxidative stress were evidenced throughout partial inhibition in biomarkers related with neurotoxicity (AChE) but there were no significant differences in the other biomarkers. Adittionally, significant differences in dehydrogenase, catalase and carboxylesterase activity were found between the substrate and the substrate bonded to plastics(biofilm). These differences indicate that worms are capable of expressing potentially polymer-degrading exoenzymes , such as catalases and indirectly carboxylesterase, an enzyme involved in the detoxification metabolism of xenobiotics as endogenous substances (in our case plastics).These preliminary results suggest that plastics act as biofilms that support the detoxifying microorganisms and exoenzymes that worms stimulate with their activity, thus resulting in a possible complementary strategy of in situ bioremediation where the interaction of earthworms with plastics in the soil it plays a potential biostimulant role. Regarding the physical-chemical characteristics of the substrate, the result obtained seem to indicated a good degree of mineralization and stabilization of the organic matter content with slightly differences in the degradative capacity of the worms with plastic presence.

Keywords: Eisenia fetida, Vermicomposting, ecotoxicology, earthworm and plastic.

Introduction

Earthworms represent the most abundant animal biomass in soils. They are key invertebrates in the decomposition of organic matter (OM) into inorganic matter available to plants. Earthworms generate interactions with many soil microorganisms, which accelerate the rates of decomposition of OM and removal of certain contaminants. Earthworms are considered natural bioreactors because some microorganisms are proliferated in their gizzard and because they provide suitable conditions for the biodegradation of waste (*Munnoli et al., 2010*). They produce nutrients to the microorganisms creating a symbiotic and synergistic interaction (*Aira et al., 2007*; *Sanchez-Hernandez et al., 2009*). One of the most successful approaches to obtain products with high fertilizer and added value from the organic waste is vermicomposting process, which represent a cost-effective biotreatment with low technical requirement to convert organic waste into stabilized humic like products by means of worms (*Sáez et al 2021*).

One of the great challenges facing agriculture and the food industry is the use of plastics. It is a very complex management to carry it out and the rate of recovery of plastic waste for agricultural use is very low due to the difficulty in recycling this type of materials. The great diffusion of plastic in our society is due to a range of characteristics of the plastic material like their low-density, lightness, strength, workability and low cost compared to other materials. The most common polymers used in agriculture are polyethylene and polypropylene. Concerning food packaging plastic waste, the 5 most common polymers used are listed by several authors as PE (including LDPE, LLDPE, and HDPE), PP, PS, PET and PVC.

In general, natural degradation starts with photo-degradation leading to thermo-oxidative degradation. The sun UV light serves as activation energy, which is necessary to build oxygen atoms into the plastic or, to be more precise, into the polymer. These processes result in brittleness of the material, because of which it breaks into smaller and smaller pieces. When the molecular weight is sufficiently low it can finally be metabolized by microorganisms. Therefore, depending on the polymer, natural degradation is a very slow process that can take several decades (*Webb et al., 2013*).

The process of plastic degradation is determined by both environmental conditions and physicochemical properties of polymeric substances. The physicochemical properties of plastic play an important role in the degradation process. The hypothesized model on plastic degradation by vermicomposting technology, which is described as a two-step process: 1) the cast-associated process, where the microorganism in earthworms cast and other decomposer fauna (Collembolans) actively participate in further decomposition of OM content. 2) the gut-associated process where the fresh OM ingested by earthworms undergoes physical and biochemical transformation that are mediated by enzymes released to the luminal space by both, symbiont microorganism and the earthworms gut epithelium (*Sánchez-Hernández et al., 2020a*).

Material and methods

The experimental design consisted in a microcosm bioassay whereby the earthworms were exposure to a different plastic materials presence under vermicomposting conditions. The propose of the bioassay is used to *Eisenia fetida* to increase the biodegradable polymer biodegradation rate by creating optimal habitats and conditions for microbial proliferation. Three replicates (n=3) were prepared with substrate + earthworms as control treatment, three replicates with substrate + plastic without earthworm presence and finally three replicates were prepared with substrate+plastic+earthworms for each type of plastic material tested (Figure 1).

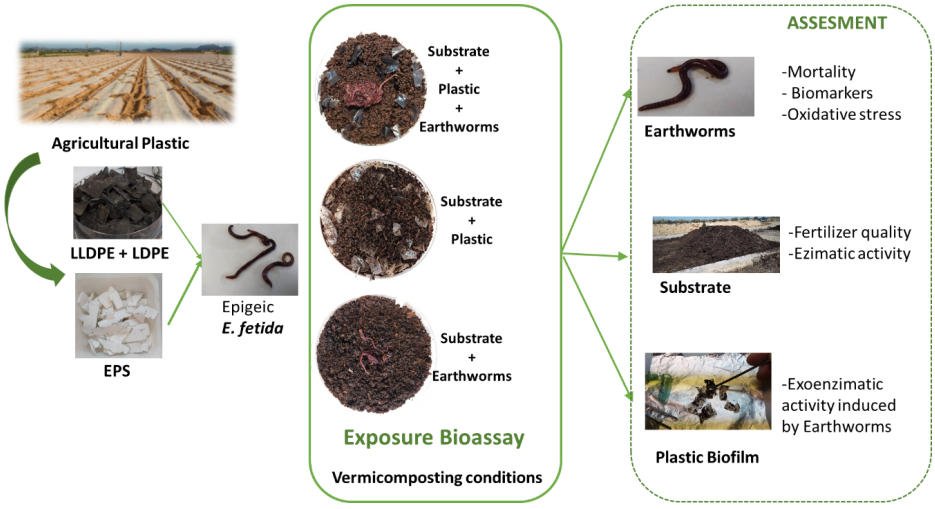


Figure 1. Experimental design of microcosm bioassay.

The test vessels were kept under controlled conditions (*Sánchez-Hernández et al., 2020b*). The water content considered to adjust to 70% moisture used distilled water and periodically tested in each test vessel. Dairy the petri dish was open to improve the aerobic conditions into the substrate mix. Time zero samples were taken from each replica. After 7, 21, 30 and 45 days of exposure, the earthworms were gently removed from the Petri dish by manual sorting, counted for survival, weighed and recorded. At the end of the microcosm bioassay (45d) the worms were extracted and harvested in each replica; the substrate was homogenized with a spatula and sampled. Finally, plastic materials with substrate biofilms were carefully sampled to discriminate the potential of enzymatic activity in this biofilm to promote plastic degradation.

A specific collection of plastics was chosen for this study: virgin and used LDPE + LLDPE blend with metalocenes,; transparent film virgin and used LDPE + LLDPE blend with metalocenes. and expanded polystyrene (EPS), virgin and used.

Table 1. Proportion and characteristics of final product.

Compost (vol %- 45% PP + 35 % AS+ 15 % CM+ 5 % VS)							
Physic chemical		**Macronutrients**		**Heavy metals**		**Mature parameters**	
pH	7,8	TN (g/Kg)	21,3	Ni (mg/Kg)	7.6	IG (%)	108
EC (dS m^{-1})	4,5	P (g/Kg)	0,41	Pb (mg/Kg)	7,3	C_{HA} (%)	1,93
BD (g/l)	486	K (g/Kg)	1,01	Hg (mg/Kg)	< 0,1	C_{FA} (%)	2,30
OM (%)	60,3	Na (mg/Kg)	225	Zn (mg/Kg)	84,6	CIC (meq/100 g MO)	128
TOC (g/Kg^{-1})	225	Mg (mg/kg)	650	Cr (mg/Kg)	36,9	Phenols (mg/Kg)	454

EC: Electrical conductivity, OM: Organic matter, TOC: Total organic carbon; BD: Bulk density.

For the develop of the microcosm bioassay, adult citellated earthworms were selected by international guidelines (*OECD, 2016*). The substrate was obtained from a composting commercial-pile scale (10 m^3) prepared using the agri-food sludge (AS) obtained from the processing of citrus fruit to produce flavor food, mixed with cow manure (CM) (obtained from a daily farm of 500 heads of capacity) as labile organic carbon and nitrogen sources in composting process. To improve the aeration during the process and adjust the C/N ratio of initial mixture close to 25, lignocellulose materials were used as bulking agents consist in the

pruning waste of two different crops (persimmon and vine shoot pruning, PP and VS, respectively) the proportion and characteristics of final product can see in Table 1.

Experimental development

The experimental design consisted of incubation under controlled conditions using Petri dishes (ø15 cm) of (n = 50) individuals with plastic material in proportion (1.25% w/w, particle size 1 cm^2) in 80 g of substrate obtained from a commercial composting pile. For film format plastic, scissors were used to cut into small pieces with irregular shape with approx. 1 cm^2 of surface, which was added in 1g for replicate. The EPS materials were cut with steel guillotine in small pieces with approx. 1 cm^2 of surface and 1-2 mm of thickness, which was added in 1g for replicate.

Sample preparation for Biochemical measurement

For the homogenization of the bodies of earthworms and the preparation of the water suspension of the substrate, the method described in *Sánchez-Hernández et al., 2017* was carried out following.

Methods and parameters analyzed

The physiochemical parameters in substrate samples were determined as following described; electrical conductivity (EC) and pH were measured in a 1:10 water extract (w/v), moisture content was determined after drying to constant weight at 105°C for 24h, OM content in compost samples by loss on ignition at 550°C for 4 h. Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) were determined by burning the samples at 1020°C in an automatic elemental microanalyzer (*EuroVector Elemental Analyzer, Milano, Italy*). After (HNO_3/H_2O) (1:1 v/v) microwave (CEM, mod. MARS ONE) assisted digestion, P was assessed calorimetrically as molybdovanadate phosphoric acid (*Kitson et al., 1944*), Na and K was determined by flame photometry (Jenway PFP7 Flame Photometer). Other nutrient (Ca, Cu, Mg, Fe Mn, Zn) and toxic heavy metals (Cr, Ni, Cd, Hg, Pb) were determined by ICP-OES. The measured of total phenol content was done by antioxidant assay in water extract (1:20) assessed at 765 nm based on Folin-ciocalteau reaction (*Beltran et al.,1999*). For compost, the humic-like determination of substrate samples were extracted with 0.1 M NaOH, from which fulvic acid-like C (C_{FA}) was separated through acid precipitation of the humic acid-like C (C_{HA}). The extracted (C_{ex}) and supernatant (C_{FA}) were analyzed in an automatic carbon analyzer for liquid samples. Water soluble carbon (WSC) was determined in 1:20 water extract (w/v) using the same automatic analyzer for liquid sample. The enzymatic activities in substrate and plastic biofilm were determined the carboxylesterase (CBe) dehydrogenase (DH) and catalase activity by *Sánchez-Hernández et al., 2019*.

Results and discussion

Survival and body weight evolution of *Eisenia fetida*.

In our experiment, mortality of earthworms was observed mainly at the beginning of microcosm bioassay. In all treatments the rate of survival showed a decrease trend in initial stage followed by a stabilization until end of bioassay, except in control without plastic materials. Population and density of earthworms have been described as one of the key biotic factors, which affects various physiological processes, such as respiration rate, reproduction rate, feeding rate and burrowing activity (*Yadav et al., 2011*). The maximum body biomass was reached at 21 d of bioassay in control test vessel. In contrast, a worsening in body weight were observed in all treatment with constant trend during the study. Test vessel from Control treatment was able to

maintain a higher density of earthworms with less mortality, beside enhancement the body weight of *E. fetida* if compare with plastic treatment. Since have been reported that earthworms consume half of their weight per day (*Malinska et al.,2016*), showed that the nutrient capacity of substrate material were not a limiting factor.

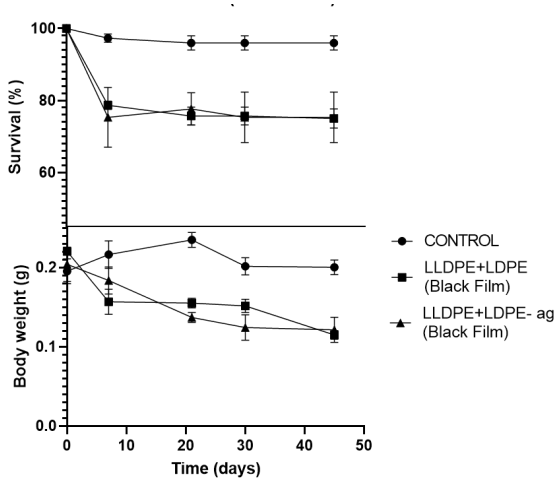


Figure 2. *Evolution of survival Eisenia fetida with LLDPE + LDPE (Black film).*

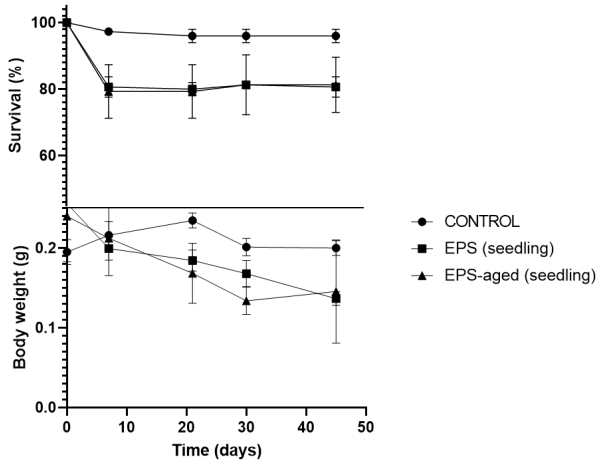


Figure 3. *Evolution of survival Eisenia fetida with EPS (Seeding).*

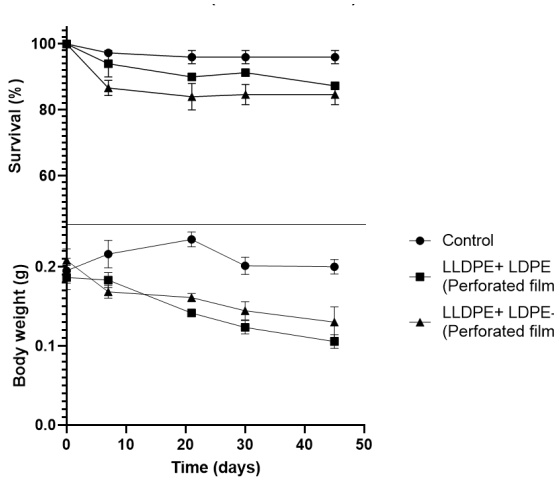


Figure 4. *Evolution of survival Eisenia fetida with LLDPE + LDPE (Perforated film).*

Table 2. Evolution of survival Eisenia fetida (45d)

Sample		Survival
Plastic + Earthworms	LLDPE + LDPE (Black Film)	70.67a
	LLDPE + LDPE-aged (Black film)	67.33a
	LLDPE + LDPE (Perforated film)	87.33a
	LLDPE + LDPE – aged (Perforated film-aged)	85.33a
	EPS (seedling)	80.67a
	EPS - aged (seedling-aged)	74.00a
No plastic with earthworm		95.67a
F-Anova		3.386*

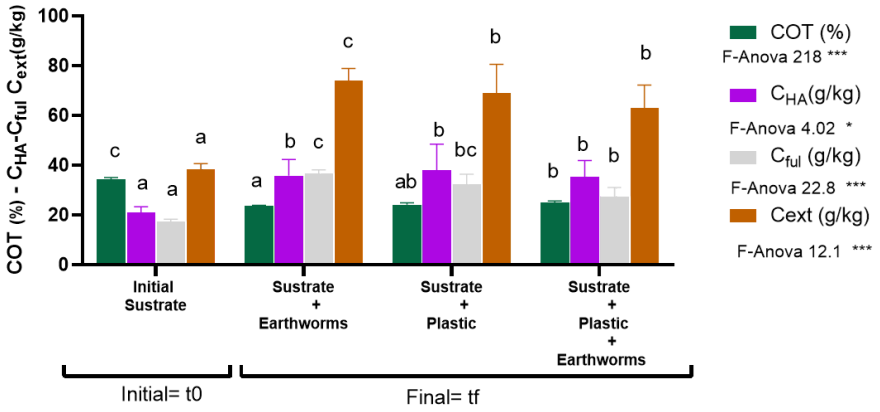
Evolution of the main physicochemical characteristic of substrate during vermicomposting

The pH values are significantly increased in test vessel without earthworms and with plastic materials if compared to initial substrate value. Probably this increase could be due to actively used of microbiota that utilizes the carbon fraction of the amino acids as energy source, realizing ammonia, which cause pH increase. Several reason may be explaining this increase: 1) The greatest degradation of OM content in this treatment could promote the release of volatile fatty acids with the subsequent decrease in pH. 2) On the other hand, the mucus of *E. fetida* add to ingested materials, have been demonstrated that leads to neutralizing the substrate (*Pérez-Godinez et al.,2017*). 3) The greatest humic substances polymerization observed in treatment with earthworms, and the carboxylic and

phenolic groups of these humic substances are two of the most important materials for plummeting the pH.

The dynamics of EC also showed significant difference. In presence of plastic material, the test vessel with earthworms showed highest final EC values compared with test vessel without earthworms, regardless of the type of plastic material tested. The reason of EC rise in treatment with earthworms may be attributed to highest mineralization of organic matter, which release nutrient ions and soluble salt (*Bernal et al.,2009*).

The general trend in TOC content shows sharp decrease in all treatments. Earthworms are known to accelerate the rate of OM mineralization during vermicomposting process, consequently leading to losses of total organic carbon by biotransformation. In theory, total organic matter (MOT) should descend as the process progresses, due to the degradation action of the earthworms and microorganisms that act. In the experiment, there are significant differences in the evolution of OM in plastic treatments and earthworms vs their controls (with and without plastic). Like MOT, total organic carbon (TOC) decreases its content throughout the vermicomposting process because of mineralization. There are significant differences in TOC in all plastic treatments except LLDPE + LDPE (Perforated film).



TOC (Total Organic Carbon), C_{HA} (acid humic carbón), C_{ful} (acid fulvic carbon).

Figure 5. *Evolution physicochemical characteristics.*

The content of N decrease at the end of the vermicomposting process. However, like the results obtained, the loss of OM that occurs throughout the process translates into a reduction in the weight of the mass to be vermicomposted. This reduction in mass makes the nitrogen species, experience the so-called “concentration effect”. In contrast, for TN content in substrate a clear trend not found, in general the TN slight increase in both, in test vessel with earthworms and without earthworms. The Phosphorus content, the results show significant differences between the process of vermicomposting with plastics and composting with plastics with respect to its control, as might be expected. It also increases the rest of the nutrients by the "concentration effect".

There are differences in the fulvic fraction of the carbons. This phenomenon is explained by the worsening of the polymerization/humification/solubilization capacity of MOT suffered by worms after being exposed to the presence of plastic.

Sample	pH	CE (dS m^{-1})	MOT (%)	COT (%)	TN (%)	P (%)	K (%)	C_{AF} (%)	C_{AH} (%)	C_{Ext} (%)
LLDPE + LDPE (Black Film) with earthworm	7,23a	4,80c	53,60a	26,20c	2,30b	0,81 b	1,30b	2,63b	4,10b	6,77b
LLDPE + LDPE (Black Film) without earthworm	8,03c	3,20b	52,17a	24,57b	2,40c	0, 83 b	1,20b	3,37c	4,63b	8,03c
Substrate (t=45d)	7,42a	5,42	52,98a	23,70a	2,23ab	0,81 b	1,20b	3,65d	3,58b	7,38bc
Substrate (t=0)	7,73b	2,70a	70,87b	34,37d	2,16a	0,41a	1,00a	1,73a	2,10a	3,80a
F-Anova	51,03***	267,02***	107,46** *	626,47***	22,54***	149,74***	18,81***	192,90***	13,65***	65,02***
LLDPE + LDPE-aged (Black film) with earthworm	7,43a	4,27c	55, 20a	25,00b	2,30b	0,82 b	1,30b	2,80b	3,53b	6,33b
LLDPE + LDPE-aged (Black film) without earthworm	8,00c	3,30b	51,30a	24,20ab	2,30b	0,80 b	1,23b	3,27bc	4,33b	7,70c
Substrate (t=45d)	7,42a	5,42d	52,98a	23,70a	2,23ab	0,81 b	1,20b	3,65c	3,58b	7,38bc
Substrate (t=0)	7,73b	2,70a	70,87b	34,37c	2,16a	0,41 a	1,00a	1,73a	2,10a	3,80a
F-Anova	24,754** *	186,628** *	51,762** *	314,361** *	4,292*	129,613** *	14,888** *	42,111***	9,312**	37,390** *
LLDPE + LDPE (Peforated film) with earthworm	7,47a	4,43b	55,73a	24,40a	2,30a	0,81 b	1,20b	2,50b	3,27a	5,73b
LLDPE + LDPE (Peforated film) without earthworm	8,20c	3,17a	54,73a	23,73a	2,27a	0,82 b	1,00a	2,97c	3,23a	6,20b
Substrate (t=45d)	7,43a	5,42c	52,98a	23,70a	2,23a	0,81 b	1,20b	3,65d	3,58a	7,38b
Substrate (t=0)	7,73b	2,70a	70,87b	34,37b	2,16a	0,41 a	1,20b	1,73a	2,10a	3,80a
F-Anova	62,022** *	96,473***	45,057** *	222,345** *	1,981 NS	145,048** *	11,881**	127,691** *	2,702 NS	16,015** *
LLDPE + LDPE-aged (Peforated film) with earthworm	7,37a	4,37c	55,60a	25,10b	2,30bc	0,76 b	1,20b	2,73b	2,97ab	5,70b
LLDPE + LDPE-aged (Peforated film) without earthworm	8,20c	3,23b	52,53a	24,20ab	2,37c	0,81 b	1,17b	3,13c	2,57ab	5,70b
Substrate (t=45d)	7,42a	5,42d	52,98a	23,70a	2,23ab	0,81 b	1,20b	3,65d	3,58b	7,38c
Substrate (t=0)	7,73b	2,70a	70,87b	34,37c	2,16a	0,41 a	1,00a	1,73a	2,10a	3,80a
F-Anova	68,218** *	177,803** *	78,807** *	493,277** *	12,054***	59,641***	8,189**	94,575***	4,314*	28,386** *

Table 3a. Evolution of the main physicochemical characteristic of substrate during vermicomposting.

Sample	pH	CE (dS m^{-1})	MOT (%)	COT (%)	TN (%)	P (%)	K (%)	C_{AF} (%)	C_{AH} (%)	C_{Ext} (%)
EPS (seedling) with earthworm	7,2 a	4,6 b	57,0 a	24,6 b	2,2 a	0,81 b	1,2 b	2,47 b	3,16 a	5,63 b
EPS (seedling) without earthworm	8,2 c	2,9 a	54,7 a	23,7 ab	2,4 b	0,81 b	1,1 b	2,73 b	3,30 a	6,07 b
Substrate (t=45d)	7,42a	5,42d	52,98a	23,70a	2,23ab	0,81 b	1,20b	3,65d	3,58b	7,38c
Substrate (t=0)	7,73b	2,70a	70,87b	34,37c	2,16a	0,41 a	1,00a	1,73a	2,10a	3,80a
F-Anova	68,218** *	177,803** *	78,807** *	493,277** *	12,054** *	59,641** *	8,189* *	94,575***	4,314*	28,386** *
EPS (seedling)-aged with earthworm	7,30a	4,57b	56,17a	25,33b	2,20a	0,75 b	1,20a	3,40b	4,17b	7,47b

EPS (seedling)-aged without earthworm	8,20c	3,03a	55,17a	24,63b	2,43b	0,77 b	1,06a	3,93c	4,67b	8,60c
Substrate (t=45d)	7,42a	5,42c	52,98a	23,70a	2,23a	0,81 b	1,20a	3,65bc	3,58b	7,38b
Substrate (t=0)	7,73b	2,70a	70,87b	34,37c	2,16a	0,41 a	1,00a	1,73a	2,10a	3,80a
F-Anova	62,967** *	153,069** *	96,135** *	589,435** *	21,825** *	46,110** *	5,121*	149,680** *	12,659** *	70,425** *

Table 3b. Evolution of the main physicochemical characteristic of substrate during vermicomposting.

Effect of plastic materials presence on substrate enzymatic activities

The DH activity presented significant difference among all treatment with earthworms and the control treatments (virgin and used) without earthworms has been shown by ANOVA test. This indicates a remained high metabolic activity in control treatments without earthworms, probably due to a lower stabilization of substrate reached in this samples reached due to degradative activity in gut of Earthworms. The plastic-free control treatment with earthworms and the LDPE+LLDPE and EPS treatments don't show great difference. This could be attributed to a loss of the most available organic substances and the subsequent reduction in DH enzyme activity. So, this point demonstrated that the plastic material tested in this study not affected to degradative capacity of Earthworms. The trend of DH in plastic biofilm was different that observed for the substrate. In general, the treatment with used plastic exhibited a lower dehydrogenase activity except for EPS.

The result obtained showed the highest catalase production in samples with plastic material and earthworms compared with control samples without earthworms, in both used and virgin plastic. Therefore, it seems that the metabolic activity of the earthworms stimulates the increase of this oxidoreductase. But some data variability was obtained which has probably prevent the existence of significant differences. In biofilm sample, was observed the same behavior in all treatments. All plastic treatment led to a sharp decrease in biofilm CAT activity if compare with substrate, with a mean decrease of 85%. A potential reason for the observed reduction at lower levels could have been the ability of some plastic additives to act as catalase inhibitors. The gut associated processes of earthworms increase the released of CAT enzyme in biofilm, although not significantly if compare with Control.

At the end of the experiment the microbiota present in the compost triggers the production of DH and CBe, especially in the substrate. On the other hand, DH was reduced in the treatments (indicative of a higher stability of the OM content and lower microbial activity). CBe and especially catalase in treatment with plastic and earthworms (related to oxidative stress and acting as a physiological free radical barrier) showed high values if compare with control treatment without earthworms.

There are significant differences in DH, catalase and CBe activity between the substrate and the substrate attached to the plastics. The plastics act as biofilms that support the microorganisms and exoenzymes that the worms generate for detoxification. These differences indicate that the worms can express potentially plastic biodegrading exoenzymes, such as catalases and indirectly Cbe.

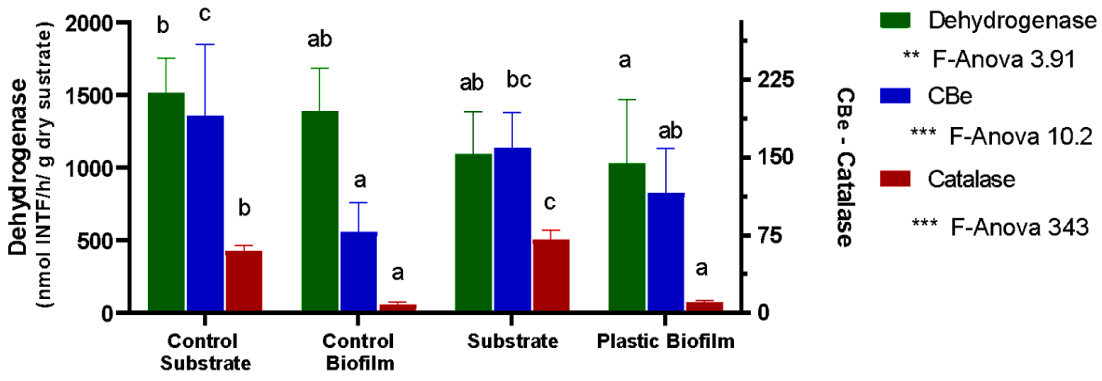


Figure 6. *Mean values of Enzyme activity in substrate and biofilm.*

Effect of plastic materials presence on biomarkers activities

Our results indicate that AChE in *E. fetida* exposed to LLDPE+LDPE and EPS, not significantly. Therefore, the action mechanism of plastic material on AChE still remains to be elucidated, but we can

assume that the concentration of plastic (1,25%) as well as the size of the plastics tested seem not affect the AChE activity.

Regard to lipid peroxidation, the result obtained are not in accordance with the expected. Our result shown as the control treatment reached the highest value at the end of exposure bioassay, while all the plastic treatment, except EPS used, followed the same trend, shown low levels value of lipid peroxidation. We speculated that the *E. fetida* has been able to avoid the exposure to plastic material due to the size of plastic tested. On the other hand, the worm's density in control Vessel due to low level of mortality and the longtime of exposure could be a reason to oxidative damage detected.

Conclusions

Indirect exposure to plastic fragments by earthworms generates different negative effects. These affects are increased or decreased depending on the size, the type of plastic, the additives it has and the proportion of fragments found in the environment. The presence of this type of xenobiotic activates various mechanisms in the metabolism of the worm such as detoxification and oxidative stress.

Regard to vermicompost process and substrate: a) The exposure to plastic material tested (LLDPE+LDPE and EPS) not seem to affect the evolution of Vermicomposting process, b) The degradative capacity of both symbiont microorganism and gut epithelium of earthworms not decrease due to exposure to LLDPE + LDPE and EPS as shown the TOC and carbon humic like evolution, c) The substrate attached to plastic (biofilm) showed a highest exoenzymes activities (DH, catalase and CBe) at the end (45d) of bioassay if compare with control treatment. These differences indicate that the worms are capable of expressing potentially plastic biodegrading exoenzymes, such as catalases and indirectly CBe, d) The partial inhibition in catalase activity in biofilm compared with substrate could be an indicative of the partial degradation of the plastic material with the subsequent release of xenobiotics compounds, e) The final substrate showed a good mature and stabilized characteristic in treatment with plastic material.

Regard to Response of *E. fetida*: a) The significant differences in *E. fetida* body weight between the bioassays with plastic (virgin and aged) and without plastic can be an evidence that the presence of the xenobiotic derived from plastic material induces a worsening of the environmental conditions, b) The highest mortality observed (mainly at the beginning (7d) of exposure essay) in treatment with plastic material, would seem to indicate a first step of adaptation and later step of stabilization for Earthworms, c) The long exposure time of our study (45d) compared with previous studies (28d) (*Chen et al.,2020*), could negative affect to control earthworms in biomarker of oxidative damage such as lipid peroxidation, d) The slight increase in CBe and AChE (not significant) in *E. fetida* body of plastic treatment with respect to control. Indicate the induction of oxidative stress due to exposure of LLDPE+ LDPE and EPS in the proportion (1,25%) tested.

Bibliography

Aira, M., F. Monroy and J. Domínguez, 2007. *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae) Modifies the Structure and Physiological Capabilities of Microbial Communities Improving Carbon Mineralization during Vermicomposting of Pig Manure. Microb Ecol., 662-671.

Al-Salem, S.M., Bumajdad, A., Khan, A.R., Brajendra, K. Sharma, Chandrasekaran, S.R., Al-Turki, F.A., Jassem, F.H., Al-Dhafeeri, A.T., 2018. Non-isothermal degradation kinetics of virgin linear low density polyethylene (LLDPE) and biodegradable polymer blends. J. Polym. Res .25, 111.

Chen, Y., Liu, X.,Leng, Y., Wang, J., 2020. *Defense responses in earthworms (Eisenia fetida) exposed to low-density polyethylene microplastics in soils, Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 187, 109788, ISSN 0147-6513.

Chiappero, L.R., Bartolomei, S.S., Estenoz, D.A., Moura E.A.B., Nicolau, V.V., 2021. Lignin-Based Polyethylene Films with Enhanced Thermal, Opacity and Biodegradability Properties for Agricultural Mulch Applications. J Polym Environ 29: 450–459.

Dorigato, A., Pegoretti, A., Fambri, L., Lonardi, C., Slouf, M., Kolarik, J., 2011. Linear low density polyethylene/cycloolefin copolymer blends. Express Polymer Letters. 2011; 5(1) 23-37.

E.A. Pérez-Godinez, J. Lagunes-Zarate, J. Corona-Hernández, M. Barajas-Aceves. Growth and reproductive potential of Eisenia foetida on various zoo animal dungs after two methods of pre-composting followed by vermicomposting Waste Manag., 64 (2017), pp. 67-78.

E.A. Pérez-Godinez, J. Lagunes-Zarate, J. Corona-Hernández, M. Barajas-Aceves. Growth and reproductive potential of Eisenia foetida on various zoo animal dungs after two methods of pre-composting followed by vermicomposting Waste Manag., 64 (2017), pp. 67-78.

Fotopoulou, K.N., Karapanagioti, H.K., 2017. Degradation of various plastics in the environment. The Handbook of Environmental Chemistry Hazardous Chemicals Associated With Plastics in the Marine Environment, 71–92.

Kitson, R.E., Mellon, M.G., 1944. *Colorimetric determination of phosphorus as molybdivivanadophosphoric acid. Ind. Eng. Chem. Anal.* Ed. 16, 379-381.

M.P. Bernal, J.A. Alburquerque, R. Moral Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review Bioresour. Technol., 100 (2009), pp. 5444-5453.

Malinska, K., Zabochnicka-Swiatek, M., Caceres, R., Marfa, O., 2016. *The effect of precomposted sewage sludge mixture amended with biochar on the growth and reproduction of Eisenia fetida during laboratory vermicomposting. Ecol. Eng*. 90, 35–41.

Munnoli, P.M., J.A. Teixeira da Silva and S. Bhosle, 2010. Dynamics of the soil-earthworm-plant relationship: a review. Dynamic Soil, Dynamic Plant 4 (special Issue 1), 1-21.

Niaounakis, M., Kontou, E., 2005. Effect of LDPE on the thermomechanical properties of LLDPE-based films. J Polym Sci B 43: 1712.

OECD (2016), *Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264496-en.

Pramanik, P., Ghosh, G.K., Ghosal, P.K., Banik, P., 2007. *Changes in organic—C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under limiting and microbial inoculants. Bioresour. Technol.* 98, 2485–2494.

Sáez, J.A., Pérez-Murcia, M.D., Vico, A., Martínez-Gallardo, M.R., Andreu-Rodríguez, F.J., López, M.J., Bustamante, M.A., Sánchez-Hernández, J.C., Moreno, J., Moral, R. Olive mill wastewater-evaporation ponds long term stored: Integrated assessment of in situ bioremediation strategies based on composting and vermicomposting (2021) Journal of Hazardous Materials, 402, art. No. 123481.

Sánchez-Hernádez, J.C., C. Mazzia, Y. Capowiez and M. Rault, 2009. Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 150: 503-511.

Sánchez-Hernádez, J.C., Ximena Andrade Cares, Jorge Domínguez, Exploring the potential enzymatic bioremediation of vermicompost through pesticide-detoxifying carboxylesterases, Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 183, 2019, 109586, ISSN 0147-6513

Sánchez-Hernádez, J.C., Yvan Caoiwiez, and Kyoung S. Ro ACS *Sustainable Chemistry and Ensgineering* 2020 a. Potential Use of Earthworms to Enhance Decaying of Biodegradable Plastics. 8(11), 4292-4316.

Sánchez-Hernádez, J.C., Yvan Capowiez, and Kyoung S. Ro. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 2020b *8* (11), 4292-4316. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b05450

Sánchez-Hernández, J.C., Sandoval, M., Pierart, A., 2017. *Short-term response of soil enzyme activities in a chlorpyrifos-treated mesocosm: Use of enzyme-based indexes, Ecological Indicators.* Volume 73, Pages 525-535, ISSN 1470-160X.

Webb, H., Arnott, J., Crawford, R., Ivanova, E., 2013. Plastic Degradation and Its Environmental Implications with Special Reference to Poly (ethylene terephthalate). Polymers 5 (1), 1–18.

Yadav KD, Tare V, & Ahammed MM 2011. Vermicomposting of source-separated human faeces by Eisenia fetida: effect of stocking density on feed consumption rate, growth characteristics and vermicompost production. Waste Management. 31: 1162-1168.

Efecto sobre la calidad del fruto del naranjo Navel v. Chislett Summer empleando varias opciones de manejo agronómico en una finca del sureste español

S. Sánchez Méndez, E. Martínez Sabater, A. Pérez Espinosa, J. Sáez Tovar y R. Moral

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández EPS-Orihuela, Ctra. Beniel km 3,2, 03312-Orihuela (Alicante). E-mail: silvia.sanchez16@alu.umh.es

Resumen

El aporte de materia orgánica al suelo mejora muchas de las propiedades del suelo, tanto a nivel físico como químico y biológico. Los bajos niveles de materia orgánica (MO) en los suelos del sureste español, junto con la escasa pluviometría de esta zona, hace que el estudio del aporte de materia orgánica exógena y el control del riego sean esenciales para una optimización de los recursos agronómicos, tanto a nivel del suelo como cultivo. Esto repercutirá indudablemente en la productividad y calidad final del fruto, claves para una explotación agraria. En concreto este ensayo de campo se realizó en la Finca Las Moreras de naranjos, situada en el término municipal de Almoradí (Alicante). Este ensayo pretende estudiar el efecto combinado de dos variables experimentales sobre la calidad y producción del fruto: 1º) variable, fertilización orgánica, dos dosis de aporte al suelo 30 kg/árbol, 60 kg/árbol de MO, y tratamiento control, denominadas E30, E60 y E0, respectivamente, y la 2ª) variable, riego del cultivo, con un tratamiento al 50% y 75% de riego, y riego total, denominadas D50, D25 y D0, respectivamente. El aporte de carbono orgánico exógeno proviene de una enmienda orgánica a base de lodo de depuradora y restos de poda de jardinería urbana, materiales próximos a la finca estudiada, con la finalidad de contribuir a la gestión de residuos cercanos dentro de la economía circular. Tanto a nivel campo como en laboratorio se han medido los distintos parámetros de producción y de calidad de la naranja tales como nº de frutos, kg de fruto/árbol, peso, diámetro, altura, espesor de la corteza (0º y 180º), e índice de color del fruto, y en zumo sólidos solubles y acidez. La variable riego influyó de manera significativa en varios de los parámetros, Tanto el número de frutos como el rendimiento en peso del árbol (kg fruto/árbol) parecen disminuir con la reducción del riego. En cuanto a la calidad del fruto la reducción del riego afecta disminuyendo los sólidos solubles del zumo. Sin embargo, sería necesario ampliar este estudio a largo plazo, para poder justificar de forma más contundente la utilización de estas técnicas de manejo (reducción de riego y enmiendas orgánicas) para la mejora en la producción, calidad de fruto y productividad de la finca.

Palabras clave: aporte de materia orgánica, riego, naranja, calidad y producción de fruto

Effect on fruit quality of Navel v. Chislett Summer orange trees using various agronomic management options in a farm in southeastern Spain

Abstract

Organic matter inputs to the soil improve many of the soil properties, both physically, chemically, and biologically. The low organic matter (OM) levels in the southeastern Spanish soils, together with the low rainfall rates of this area, make the study of exogenous organic matter supply and irrigation control essential for optimization of agronomic resources, both at soil and crop level. This evaluation will undoubtedly have an impact on the final quality and productivity of the fruit, which is of great interest in a farm. Specifically, this field trial was carried out at Finca Las Moreras, an orange trees grove, located in Almoradí (Alicante). This trial aims to study the combined effect of two experimental variables on fruit quality and yield data. The 1st) variable: organic fertilization, two doses of 30 kg/tree, 60 kg/tree of OM and the control treatment, called E30, E60 and E0, respectively, and the 2nd) variable: irrigation of the crop, with a treatment of 50% and 75% irrigation and total irrigation, called D50, D25 and D0, respectively. The contribution of exogenous organic carbon comes from an organic amendment based on sewage sludge and urban gardening pruning waste, materials close to the studied farm, to contribute to the management of nearby waste within the circular economy. Both in the field and the laboratory, the different parameters of orange production and quality were measured, such as the number

of fruits, fruit kg/tree, weight, diameter, height, rind thickness (0º and 180º), and color index of the fruit, and juice soluble solids and acidity. The irrigation variable had a significant influence on several of the following parameters Both fruit number and tree weight yield (kg fruit/tree) seem to decrease with the reduction of irrigation. In terms of fruit quality, the reduction of irrigation has an effect on decreasing juice soluble solids. However, would be necessary to do a long term study of the variables, in order to properly justify the use of these management tecniques (déficit irrigation and organic amendments) to improve production, fruit quality and productivity of the farm.

Keywords: organic matter supply, irrigation, orange, fruit quality and production.

Introducción y/o Justificación

España es el sexto productor mundial de naranjas y ocupa el primer puesto en exportaciónde cítricos, lo que los convierte en una de las principales fuentes de entrada de divisas. En España la producción de cítricos se concentra sobre todo en naranjas (3344428 t), mandarinas (1967018 t) y limones (923192 t) (FAO, 2019).

Los niveles tan bajos de materia orgánica en los suelos del sureste español junto con su aridez, hace que el estudio de aporte de materia orgánica exógena y el control del riego sean esenciales, para intentar mejorar esta situación.

El uso de los materiales orgánicos (en forma de enmienda, compost o vermicompost) en la actividad agrícola ha sido empleado de forma tradicional desde los orígenes de la agricultura y está directamente relacionado con la fertilidad y la productividad de los suelos. (Labrador et al., 1993). El uso de enmiendas orgánicas afecta tanto a las propiedades físicas del suelo, como a las químicas y biológicas.

A nivel físico, la materia orgánica disminuye la densidad aparente del suelo (Adugna, 2016; Brown & Cotton, 2011) y mejora la estabilidad estructural debido a las sustancias húmicas. Asimismo, se favorece la porosidad y la cohesión del suelo y se potencia la infiltración del agua y el intercambio.

Material y Métodos

Diseño del experimento

El experimento tuvo lugar en la finca Las Moreras, Almoradí (Alicante) en la comarca de la Vega Baja (coordenadas 38º 1' 37.28" N, 0º 46' 1.02 " O). El ensayo duró 71 días, abarcando desde el 23 de diciembre de 2020 hasta el 4 de marzo de 2021. El clima se clasifica como mediterráneo subtropical. Durante el ensayo la temperatura media fue de 12,6 ºC, la humedad relativa media del 62% (datos obtenidos de la estación meteorológica de Almoradí, IVIA) y con episodios de lluvia más abundantes respecto a otros años. La clasificación edafológica de la zona es de tipo Aridisol, en concreto Calciorthid (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014), de textura franco-arcillosa.

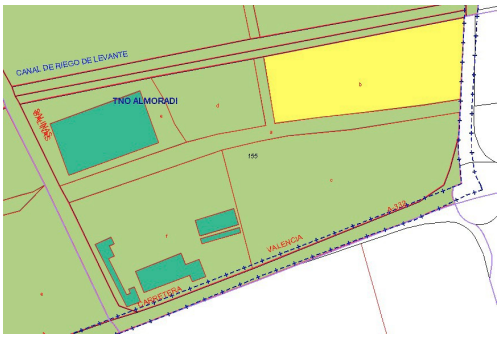


Figura 1. Localización de la finca de estudio (en amarillo se muestra la subparcela elegida). (Fuente: SIGPAC, 2020)

La subparcela elegida cuenta con 6900 m2 aproximadamente, plantados con naranjos tardíos de la variedad Chislett Summer Navel, sobre patrón Citrus macrophylla. En la subparcela hay 9 filas, y para el ensayo se seleccionaron las 3 filas centrales. En la siguiente imagen (Figura 1.) se muestra la disposición del diseño experimental con las dos variables: riego y fertilización, con aporte de materia orgánica.

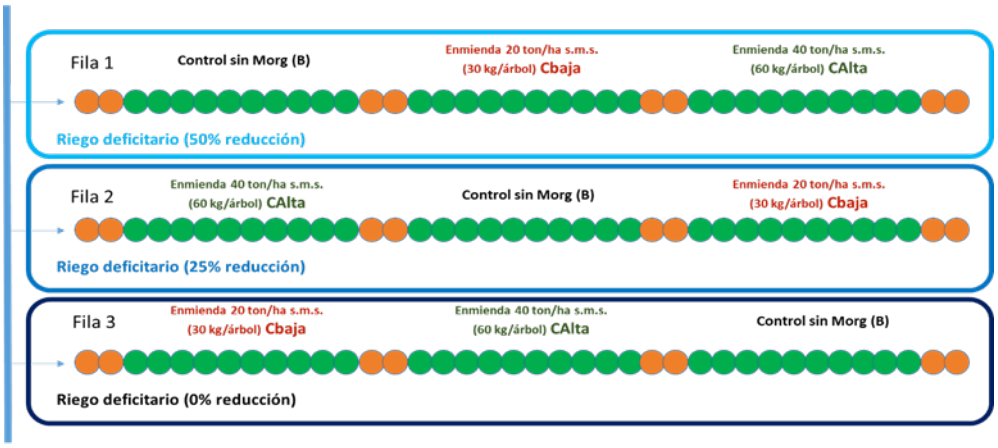


Figura 2. Diseño experimental.

En cada fila se ha aplicado un tratamiento de riego distinto y tres tratamientos de fertilización orgánica, realizado superficialmente. Los tratamientos de riego son reducción de riego al 50% (D50), al 25% (D25) y sin reducción de riego (D0), controlada esta reducción con un programador de riego. Las distintas dosis de fertilización que se han aplicado son 60 kg/árbol (E60), 30 kg/árbol (E30) y sin fertilización (E0). Como se muestra en la imagen cada fila tiene tres tratamientos de fertilización compuestos por 10 árboles (Figura 2. señalado en círculos verdes) y se alterna el orden de tratamientos en cada fila.

Para la fertilización se utilizó un compost binario de lodo EDAR de Torrevieja y poda de jardinería de Guardamar. Atendiendo al Real Decreto 506/2013 de 28 de junio sobre Productos Fertilizantes, se encontraría en el grupo 6.02 denominado como compost general. En cuanto a sus características, cumple los requisitos para ser comercializado exceptuando su contenido en MO que debería ser más del 35%, en nuestro caso la enmienda tenía un 22%. Presenta una salinidad moderada y un valor de pH neutro, su valor de carbono/nitrógeno (C/N)<20 es adecuada. Hay que destacar que además de la aplicación de la enmienda el sistema de riego de la finca tiene incorporada fertirrigación.

Muestreos y métodos analíticos del fruto

Los muestreos para evaluar la calidad de la fruta y su rendimiento tuvieron lugar el día 4 de marzo. Se cosecharon todos los frutos de los árboles de cada tratamiento para poder determinar el rendimiento en peso y el número de frutos de cada árbol. De cada tratamiento cosechado se seleccionaron posteriormente 20 frutos para la posterior determinación de los parámetros de calidad en laboratorio.

Para el análisis del rendimiento se calculó el rendimiento del árbol (n.º frutos/árbol), contando los frutos producidos por cada naranjo, y el rendimiento en peso (kg fruto/árbol) donde todos los frutos del árbol se pesaron con una balanza en campo.

También se analizaron los parámetros físico-químicos de los 20 frutos seleccionados de cada tratamiento en laboratorio: peso (kg) en balanza, diámetro, altura y espesor medidos con calibre y el índice de color medido con un colorímetro Konica Minolta Cm-700d en tres puntos distintos de la corteza (a 0º, 90º y 180º) (Jiménez-Cuesta, Cuquerella, & Martínez-Javaga, 1981). Tras haber hecho el análisis físico del fruto, se exprimió el zumo de las naranjas y se midieron los sólidos solubles (ºbrix) con un refractómetro (Atago Pocket PAL 1), la acidez (g/ml) medida con un valorador automático (Tritino plus 877) con agitador (801 Stirrer), y por último, mediante los sólidos solubles (SS) y la acidez (Ac), se obtuvo el índice de madurez, mediante la relación entre los sólidos solubles y la ácidez (SS/Ac)*10

Métodos estadísticos

El análisis estadístico estuvo basado en un análisis de la varianza GLM-Univariante, que permitió evaluar el efecto de las variables consideradas: riego y fertilización. Cuando la F-ANOVA mostró significación, se realizó el contraste post-hoc Tukey-b, a P= 95%. Previamente al ANOVA, se evaluaron la normalidad y homogeneidad de las varianzas utilizando los test de Shapiro-Wilk y Levene. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa informático SPSS 22.0.

Resultados y Discusión

Se muestran a continuación los resultados relacionados con el rendimiento de cosecha (Figura 3).

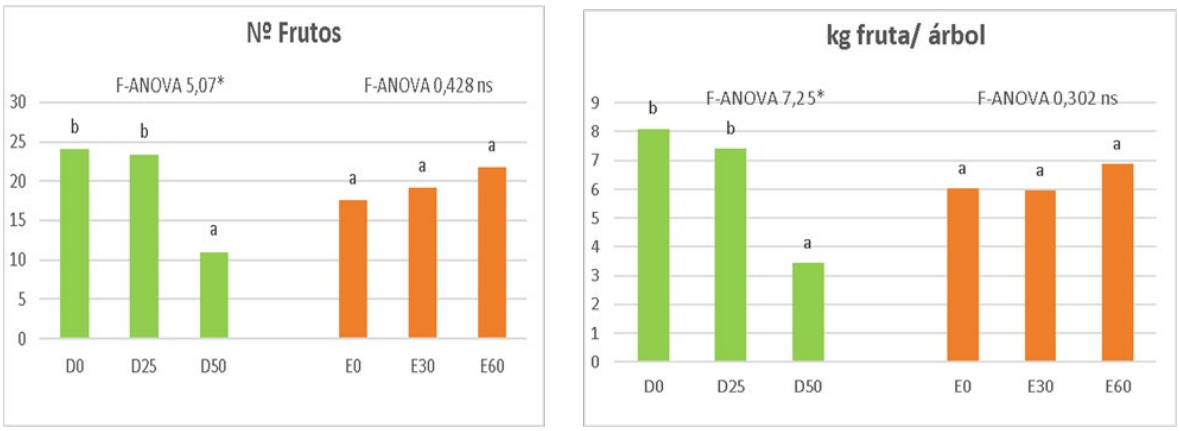


Figura 3. Rendimiento de cosecha: n.º de frutos (izq.) y peso de fruta (dcha.) por árbol.

Podemos observar diferencias significativas en el nº de frutos/árbol y en kg fruta/árbol, con valores más bajos cuando se aplica el tratamiento de riego deficitario al 50% (D50); que concuerda con lo expuesto por Mossad et al., (2020) y Nagaz et al., (2020). En cuanto a la variable fertilización no se han observado diferencias significativas. Sin embargo, autores como Vico et al. (2020) o Pascual et al., (2010) observaron que la fertilización orgánica afecta positivamente en el rendimiento de cosecha.

Según un estudio con combinación de riego deficitario y fertilización de Ding et al., (2020) el aporte de enmienda aliviaría la pérdida de rendimiento de cosecha con el riego deficitario. En nuestro caso no ha resultado así, posiblemente debido a que solo ha permanecido la enmienda y el tratamiento del riego durante 71 días antes de la cosecha. Los efectos serían más notorios a largo plazo debido a que la mejora de las propiedades del suelo es progresiva.

En la siguiente tabla se muestra los resultados relacionados con las características físicas de los frutos (Tabla 1). En cuanto a las características físicas del fruto estudiadas peso fruto, el diámetro, la altura y el espesor, no se han observado diferencias significativas en ninguna de las variables.

Tabla 1. Características físicas de los frutos.

VARIABLE	Tratamiento	Peso fruto (g)	Ø (mm)	h (mm)	Esp corteza(mm) 0º	Esp 180º corteza (mm)
Riego	**D0**	351 a	86,4 a	84,6 a	4,87 a	4,87 a
	D25	355 a	86,2 a	86,2 a	5,07 a	4,83 a
	D50	363 a	85,1 a	88,7 a	5,00 a	4,92 a
	F anova	0,068 ns	0,185 ns	1,064 ns	0,10 ns	0,977 ns
Fertilización	**E0**	367 a	87,1 a	87,5 a	5,04 a	4,89 a
	E30	346 a	86,2 a	85,6 a	5,04 a	5,00 a
	E60	357 a	84,3 a	86,2 a	4,86 a	4,73 a
	F anova	0,019 ns	0,788 ns	0,230 ns	0,102 ns	0,182 ns

Obtenido a partir de una muestra representativa de 20 frutos por cada tratamiento. Ø: Diámetro, h: Altura, Esp: Espesor- ns: no significativo.

En la tabla 2, se muestran los parámetros de calidad del fruto. Podemos observar que existen diferencias significativas en la cantidad de sólidos solubles (SS), cuyos valores más bajos lo presentan los frutos con reducción de riego D25 y D50. Se ha visto afectado asimismo el cociente sólidos solubles/acidez (SS/Ac) y el índice de color, que muestra valores máximos en los tratamientos de riego D0 y D25. Con respecto a la fertilización no ha habido diferencias significativas.

Tabla 2. Parámetros de calidad del zumo de naranja y fruto.

VARIABLE	Tratamiento	SS (ºBrix)	Ac (g/L)	SS/Ac (%)	IC
Riego	**D0**	10,12 b	6,65 a	15,4 b	8,49 b
	D25	9,30 a	7,28 a	13,0 a	8,37 ab
	D50	9,63 a	7,65 a	12,8 a	7,98 a
	F anova	14,132 ***	2,735 ns	8,03 *	4,86 *
Fertilización	**E0**	9,54 a	7,30 a	13,4 a	8,25 a
	E30	9,70 a	7,10 a	13,9 a	8,19 a
	E60	9,89 a	7,18 a	13,9 a	8,40 a
	F anova	2,031 ns	0,107 ns	0,376 ns	0,58 ns

SS: Sólidos Solubles, Ac: Acidez, E/A: relación entre los sólidos solubles y la acidez de la fruta indicándonos la madurez, IC: Índice de Color.

En otros estudios similares, como Nagaz et al., (2020); Mossad et al., (2020); Yang et al.,(2018), se observó un incremento en los SS del zumo cuando hay reducción de riego. Sin embargo, Gasque et al., (2010) en un estudio con variedad "Navelina" sobre patrón cleopatra no obtuvo diferencias significativas en los SS con los distintos tratamientos.Es posible que no se haya obtenido el el resultado esperado debido a la poca duración del riego deficitario y el momento elegido para establecerlo, que más influyente en la fase de crecimiento del fruto concretamente en la fase II, cuando se formas las vesículas de zumo. (Gasque et al., 2010).

Asimismo, el patrón utilizado ha podido influir en el valor obtenido de sólidos solubles. (Legua et al., 2014) obtuvieron que el patrón macrophylla, el mismo que se ha usado en nuestro ensayo, mostraba unos SS en fruto menores que en otros patrones.

En cuanto al índice de color (IC) podemos ver que todos los tratamientos presentan valores mayores de +7, por lo que existe predominancia del color naranja.

Conclusiones

Los parámetros de rendimiento y calidad del fruto no se han visto significativamente afectados por la fertilización, debido posiblemente a la corta duración del ensayo. Por el contrario, la variable riego si ha influido de manera significativa. Los parámetros de rendimiento que se vieron afectados por la reducción de riego fueron el número de frutos por árbol y los kg de fruta por árbol, que sufrieron una disminución con el tratamiento D50. En cuanto a la calidad del zumo, los sólidos solubles presentaron valores significativamente menores en los tratamientos con reducción de riego, al contrario que lo observado por otros autores. En el fruto hubo cambios en el índice de color con la reducción del riego al 50%, no mostrando ninguno de los otros parámetros (acidez y cociente SS/Az) cambios significativos.

Para evaluar de forma correcta la influencia de las variables estudiadas en los parámetros de rendimiento y calidad de fruto y obtener conclusiones extrapolables al manejo agronómico a escala de finca, es necesario que el ensayo se proyecte a largo plazo, seleccionando las fechas de inicio del riego deficitario y la fertilización de manera que sea posible observar sus efectos sobre la naranja.

Bibliografía

Adugna, G. (2016). A review on impact of compost on soil properties, water use and crop productivity. Agricultural Science Research Journal, 4(3), 93–104. https://doi.org/10.14662/ARJASR2016.010

Bouajila, K. & Sanaa, M. (2011). Effects of organic amendments on soil physico-chemical and biological properties. Journal of Materials and Environmental Science, 2(SUPPL. 1), 485–490.

Brown, S. & Cotton, M. (2011). Changes in Soil Properties and Carbon Content Following Compost Application: Results of On-farm Sampling. Compost Science and Utilization, 19(2), 87–96. https://doi.org/10.1080/1065657X.2011.10736983

de Bertoldi .M, Díaz. L.F, Bidlingmaier .W, S. (2007). Compost Science and Technology. In Journal of Chemical Information and Modeling (Vol. 53, Issue 9).

Diacono, M., & Montemurro, F. (2010). Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. Agronomy for Sustainable Development, 30(2), 401–422. https://doi.org/10.1051/agro/2009040

Ding, Z., Kheir, A. M. S., Ali, M. G. M., Ali, O. A. M., Abdelaal, A. I. N., Lin, X., Zhou, Z., Wang, B., Liu, B., & He, Z. (2020). The integrated effect of salinity, organic amendments, phosphorus fertilizers, and deficit irrigation on soil properties, phosphorus fractionation and wheat productivity. Scientific Reports, 10(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-020- 59650-8

EEA. (2020). Water and agriculture: towards sustainable solutions. In Report: EEA 17 (Issue 17).

Real Decreto 506/2013 del 28 de junio, sobre productos fertilzantes, 164 Boletín Oficial del Estado 5119 (2013).

European Commission. (2009). COM(2016)157/F1 - EN - laying down rules on the making available on the market of CE marked fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009. Com, 170084(157). https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2016/EN/1-2016-157-EN-F1-1.PDF

FAO. (2019). FAO. Obtenido de FAOSTAT: http://www.fao.org/faostat/es/

Gasque, M., Granero, B., Turegano, J. V., & Gonzalez-Altozano, P. (2010). Regulated deficit irrigation effects on yield, fruit quality and vegetative growth of “navelina” citrus trees. Spanish Journal of Agricultural Research, 8(SUPPL. 2), 5–7. https://doi.org/10.5424/sjar/201008s2-1347

Grindlay, A. L., Lizárraga, C., Rodríguez, M. I., & Molero, E. (2011). Irrigation and territory in the southeast of Spain: Evolution and future perspectives within new hydrological planning. WIT Transactions on Ecology and the Environment, 150(May), 623–638. https://doi.org/10.2495/SDP110521

IGN (2020). Instituto geográfico nacional . Obtenido de https://www.ign.es/web/ign/portal/inicio

IVIA. (2021). riegos IVIA. Obtenido de www.riegos.ivia.es

Jimenez-Cuesta, M., Cuquerella, J., & Martinez-Javaga, J. (1981). Determination of a color index for citrus fruit degreening. Proc. Int. Sot. Citric., 2

Karlen, D. L., Andrews, S. S., Wienhold, B. J., & Zobeck, T. M. (2008). Soil Quality Assessment: Past, Present and Future. J. Integr. Biosci., 6(1), 3–14.

Labrador, J., Cabanillas, A., López, L., y Reyes, J. L. (1993). La Materia Orgánica en los Sistemas Agrícolas. Manejo y Utilización.

Legua, P., Forner, J. B., Hernández, F., & Forner-Giner, M. A. (2014). Total phenolics, organic acids, sugars and antioxidant activity of mandarin (Citrus clementina Hort. ex Tan.): Variation from rootstock. Scientia Horticulturae, 174(1), 60–64. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.004

Melgarejo Moreno, J. (2019). Agua y economía circular

Ministerio de Agricultra, Alimentación y Medio Ambiente. (2014). Caracterización Climática de las Comarcas Agrarias de España. Tomo 5: Provincia de Alicante. Madrid

Moinard, V., Levavasseur, F., & Houot, S. (2021). Resources , Conservation & Recycling Current and potential recycling of exogenous organic matter as fertilizers and amendments in a French peri-urban territory. Resources, Conservation & Recycling, 169(February), 105523. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105523

Mossad, A., Farina, V., & Bianco, R. Lo. (2020). Fruit yield and quality of “Valencia” orange trees under long-term partial rootzone drying. Agronomy, 10(2), 1–16. https://doi.org/10.3390/agronomy10020164

Moral, R., Paredes, C., Bustamante, M. A., Marhuenda-Egea, F., & Bernal, M. P. (2009). Utilisation of manure composts by high-value crops: Safety and environmental challenges. Bioresource Technology, 100(22), 5454–5460. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.007

Nagaz, K., El Mokh, F., Ben Hassen, N., Masmoudi, M. M., Ben Mechlia, N., Baba Sy, M. O., Belkheiri, O., & Ghiglieri, G. (2020). Impact of Deficit Irrigation on Yield and Fruit Quality of Orange Trees (Citrus Sinensis, L. Osbeck, CV. Meski Maltaise) in Southern Tunisia. Irrigation and Drainage, 69(S1), 186–193. https://doi.org/10.1002/ird.2201

Pascual, I., Azcona, I., Aguilorreolea, J., Morales, F., Corpas, F. J., Rellán-Alvarez, R., & Sánchez-Díaz, M. (2010). Growth , Yield , and Fruit Quality of Pepper Plants Amended with Two Sanitized Sewage Sludges. 6951–6959. https://doi.org/10.1021/jf100282f

Pezzolla, D., Marconi, G., Turchetti, B., Zadra, C., Agnelli, A., Veronesi, F., Onofri, A., Benucci, G. M. N., Buzzini, P., Albertini, E., & Gigliotti, G. (2015). Influence of exogenous organic matter on prokaryotic and eukaryotic microbiota in an agricultural soil. A multidisciplinary approach. Soil Biology and Biochemistry, 82, 9–20. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.12.008

Raviv, M. (2005). Production of high-quality composts for horticultural purposes: A mini- review. HortTechnology, 15(1), 52–57. https://doi.org/10.21273/horttech.15.1.0052

Sanz, M. J., & Galán, E. (2020). Impactos y riesgos derivados del cambio climático en España. https://www.adaptecca.es/sites/default/files/documentos/impactosyriesgosccespanawebfin al_tcm30-518210_0.pdf

SIGPAC (2020). Obtenido de https://sigpac.mapama.gob.es/fega/visor/

Vico, A., Sáez, J. A., Pérez-Murcia, M. D., Martinez-Tomé, J., Andreu-Rodríguez, J., Agulló, E., Bustamante,

M. A., Sanz-Cobena, A., & Moral, R. (2020). Production of spinach in intensive Mediterranean horticultural systems can be sustained by organic-based fertilizers without yield penalties and with low environmental impacts. Agricultural Systems. https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.102765

Yang, Q., Wang, Y., Jia, X. mei, Zheng, Y. qiang, He, S. lan, Deng, L., Ma, Y. yan, Xie, R. jin, Yi, S. lai, & Lv,

Q. (2018). Fruit yield and quality response of Newhall navel orange to different irrigation regimes and ground cover in Chongqing Three Gorges Reservoir area. Scientia Horticulturae, 241(June), 57–64. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.083

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Presencia de plaguicidas en mezclas iniciales y compost maduros de productores agroecológicos. El rol del compostaje en su eliminación

A. García-Rández, M.T. Fernández-Suárez, M.D. Pérez-Murcia, R. Moral

Dpto. Agroquímica y Medio Ambiente, Univ. Miguel Hernández, EPS-Orihuela, Ctra. Beniel Km 3,2 03312-Orihuela (Alicante). E-mail: angarran@hotmail.com

Resumen

El uso de plaguicidas para el control de plagas y enfermedades en los cultivos está muy restringido cuando no prohibido en el sistema específico de producción de la Agricultura Ecológica, siendo clave la acreditación de su ausencia en sus productos comerciales. El compostaje es una alternativa económica y sostenible medioambientalmente para la gestión de los residuos agrícolas y ganaderos que permite la obtención de un material orgánico estabilizado que puede incorporarse a los suelos ecológicos ampliando la gama de productos que el agricultor puede disponer para su producción agrícola y para mejorar las propiedades físico-químicas de su suelo. Además, el compostaje se considera una herramienta de lucha contra el cambio climático ya que el aporte de materia orgánica a los suelos está considerado como unas de las mejores acciones de mitigación de cambio climático, según se recoge en la publicación del IPCC de 2019. En el área mediterránea, lugar de desarrollo del estudio, los suelos contienen niveles bajos de materia orgánica, y tienen un alto potencial para la mitigación del cambio climático a través del secuestro de carbono. En este estudio se plantea como objetivo principal el análisis del rol del proceso de compostaje en la eliminación o persistencia de los plaguicidas potencialmente presentes en los insumos a compostar, mediante el estudio de su presencia y cuantificación en la masa inicial y en el compost final de 25 procesos de compostaje diferentes desarrollados en la Comunidad Valenciana bajo el proyecto de Agrocompostaje y orientados a la producción ecológica.

Palabras clave: insecticida, herbicida, Agricultura Ecológica, compost.

Presencia de plaguicidas en mezclas iniciales y compost maduros de productores agroecológicos. El rol del compostaje en su eliminación

Abstract

The use of pesticides for the control of pests and diseases in crops is very restricted when not prohibited in the specific production system of Organic Agriculture, being key the accreditation of their absence in their commercial products. Composting is an economical and environmentally sustainable alternative for the management of agricultural and livestock waste. Composting allows obtaining a stabilized organic material that can be incorporated into ecological soils, expanding the range of products that the farmer can have for his agricultural production and for improve the physico-chemical properties of his soil. In addition, composting is considered a tool to mitigate climate change, according to the 2019 IPCC publication. In the Mediterranean area, where the study was carried out, the soils contain low levels of organic matter, and have a high potential for mitigating climate change through carbon sequestration. The main objective of this study is to analyze the role of the composting process in the elimination or persistence of pesticides potentially present in the inputs to be composted, by studying their presence and quantification in the initial mass and in the final compost of 25 different composting processes developed in the Valencian Community under the Agrocomposting project and aimed at organic production.

Keywords: insecticide, herbicide, organic farming, compost

Introducción

Los plaguicidas químicos han contribuido en gran medida al aumento de los rendimientos en la agricultura mediante el control de plagas y enfermedades y también al control de las enfermedades transmitidas por insectos en el sector de la salud humana. En nuestro medio se utilizan más de 500 formulaciones de plaguicidas diferentes, principalmente en la agricultura (Azevedo, 1998), y estos pueden clasificarse según su ámbito de aplicación, su objetivo, su grupo químico, su comportamiento en la planta, especificidad, vía de ingreso a la plaga, momento de aplicación y su modo o punto de acción primario. La clasificación según el grupo químico al cual pertenecen es especialmente relevante desde el punto de vista toxicológico ya que los productos de un mismo grupo producen intoxicaciones análogas y con similares tratamientos. Además, seria esperable, por tanto, que también tengan comportamientos parecidos respecto a desaparición y eliminación durante el proceso de compostaje.

El uso de cantidades cada vez mayores de plaguicidas también ha aumentado la preocupación por sus efectos adversos en organismos no objetivo, incluidos los seres humanos: muchos plaguicidas pueden persistir durante largos períodos en un ecosistema; una vez que un plaguicida persistente ha entrado en la cadena alimentaria, puede sufrir una "biomagnificación", es decir, una acumulación en los tejidos corporales de los organismos, donde puede alcanzar concentraciones muchas veces superiores a las del entorno circundante (Brewer, 1979).

El destino y comportamiento de los plaguicidas en el ambiente depende básicamente de las propiedades físicas y químicas del compuesto, así como de la forma en la que es liberado y de las condiciones del ecosistema (Pitarch, 2001). Atendiendo a su movilidad, la contaminación por plaguicidas puede tener lugar en el aire, suelo, agua y biosfera (Barberá, 1989). El aire, el agua, el suelo y los alimentos retienen gran parte de los plaguicidas que posteriormente llegarán a los seres vivos, donde también pueden acumularse de forma que constituye un problema actual su persistencia en el ambiente, su concentración y su transformación en los organismos vivos; así los efectos ecológicos de los plaguicidas son muy variados y están con frecuencia interrelacionados, además, van más allá de los organismos individuales y pueden afectar a los ecosistemas. En este sentido, según Silva (2019) en Europa los residuos de plaguicidas están presentes en el 83% de los suelos agrícolas analizados y el 58% de los suelos contenían múltiples residuos presentándose, además, una alta diversidad de combinaciones de plaguicidas. En su estudio se encontraron un total de 166 combinaciones diferentes de plaguicidas en los suelos, así como 43 residuos diferentes (aproximadamente el 57% de los analitos observados) (Silva, 2019).

El manejo de los flujos residuales orgánicos en el sector agrario se ha regido desde antaño por un principio de economía circular de la materia y la energía, que implica la reutilización, el reciclaje y la gestión de ciclo corto. La intensificación de las actividades agrícolas y ganaderas, la concentración de ciertas actividades y el encarecimiento de la mano de obra para las operaciones de manejo han roto este círculo virtuoso que históricamente convertía al territorio en un autogestor eficiente de materias. Los condicionantes ambientales, pero también económicos ligados a la dependencia de Europa de los insumos y recursos externos han hecho que la Unión Europea desarrolle todo un paquete normativo orientado a la economía circular que impregna también el manejo de residuos y que beneficia indirectamente al sector agrario al favorecer prácticas que suponen la restauración de la fertilidad orgánica del suelo y que tiene en el compostaje una herramienta muy valiosa.

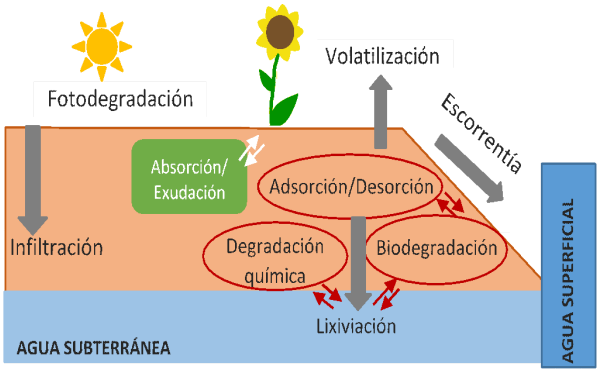


Figura 1. Procesos que rigen el comportamiento de los plaguicidas en el suelo. (Fuente: elaboración propia desde Hermosín, 2011).

En este sentido, el compostaje es un sistema de tratamiento de los residuos orgánicos con la finalidad de adecuarlos para su aprovechamiento agrícola. Esencialmente es un proceso de degradación controlada de residuos orgánicos realizada por microorganismos, cuya actividad metabólica genera calor y que permite obtener un producto estabilizado llamado compost, cuyo objetivo final es convertir un residuo en un recurso. Respecto a la presencia de contaminantes orgánicos, el compost resultante puede estar contaminado con contaminantes orgánicos que estaban presentes inicialmente en las materias primas. Sin embargo, se ha reconocido que el compostaje reduce en gran medida las concentraciones de contaminantes orgánicos en los compost finales aplicados al suelo (Amir et al., 2005; Pakou et al., 2009) y ha sido ampliamente adoptado como una estrategia en la biodegradación/biorremediación de contaminantes orgánicos en los últimos años (Semple et al., 2001).

El destino y el mecanismo de eliminación de los plaguicidas en los procesos de compostaje son en gran parte desconocidos y requieren un análisis exhaustivo; existe una gran escasez de información disponible sobre la influencia de la temperatura en la degradación microbiológica de plaguicidas. En general, los procesos de degradación en el compost son similares a los que ocurren biológicamente en el suelo (Williams et al., 1993), si bien el compostaje puede acelerar el proceso. Las temperaturas son generalmente más altas en los compost que en los suelos, lo que resulta en una mayor solubilidad de contaminantes y mayor actividad metabólica en los compost. Los altos niveles de sustrato en los compost pueden conducir al co-metabolismo de contaminantes orgánicos. La población microbiológica puede ser más numerosos y diversa en compost que en suelos. La naturaleza del contaminante orgánico, las condiciones y procedimientos de compostaje, las comunidades microbianas y el tiempo afectan los mecanismos de conversiones en compost o suelos (Williams et al., Rao et al., 1999, Weed et al., 1999). Por tanto, como señala Sikora (1998) el compostaje puede degradar varios compuestos orgánicos que pueden estar presentes en materia prima, si el proceso se lleva a cabo con la adecuada aireación, agua, relaciones C: N y duración. Sin embargo, los efectos del compostaje sobre los pesticidas no siempre son favorables. Los compuestos secundarios pueden ser igual o más tóxicos que el pesticida original. Las pérdidas por volatilización significan esencialmente que el plaguicida se ha trasladado de un lugar a otro. Si hay materiales recalcitrantes, incluidos metales, que están presentes en la materia prima, pueden permanecer inalterados o concentrados durante el compostaje (Barker et al., 2002).

La presencia de plaguicidas en los compost maduros puede ser peligroso para las personas que manipulan los materiales ya que pueden entrar en el medio ambiente y convertirse potencialmente en perjudiciales para las plantas que crecen en suelos enmendados con compost, para la biota del suelo o para el ganado que puede comer materia prima, abono o plantas cultivadas en sustrato con compost.

La ausencia de plaguicidas debe ser considerada una característica significativa a la hora de definir la calidad de un compost.

En esta línea el proyecto Agrocompostaje, iniciativa de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Generalitat Valenciana y la Universidad Miguel Hernández de Elche para desarrollar un entorno integral a largo plazo de investigación, experimentación y trasferencia en Compostaje, ha implementado un plan estructural que busca aumentar la calidad de los compost a través de un análisis de presencia de plaguicidas en las mezclas iniciales y los compost maduros. De esta manera se pretende dar respuesta a una de las inquietudes recurrentes de los operadores del sector ecológico realizando un barrido de sustancias potencialmente contaminantes que no se había hecho hasta el momento.

En este ensayo se plantea como objetivo principal el estudio del rol del proceso de compostaje en la eliminación o persistencia de los plaguicidas, mediante el estudio de su presencia y cuantificación en la masa inicial y en el compost final de 25 procesos de compostaje desarrollados en la Comunidad Valenciana bajo el proyecto de Agrocompostaje y orientados a la producción agroecológica.

Material y Métodos

Se plantearon procesos de co-compostaje de hasta 5 ingredientes en sistemas abiertos, con volteo periódico de tipo mecánico y conformando las pilas mediante sistema sándwich. En la tabla 1 se muestran las materias primas utilizadas en cada uno de los procesos de compostaje señalando en negrita el elemento mayoritario en peso fresco. En todos los procesos se realizó un control de la temperatura y volteos, así como de la exotermia del proceso mediante el parámetro EXI2 (sumatorio cuadrático de la diferencia diaria entre la temperatura promedio de la pila y la temperatura ambiente durante la fase bio-oxidativa).

Al finalizar el montaje de cada pila se realizó un muestreo de la mezcla inicial (M1) y al final del proceso de maduración se muestreó compost maduro (M3) conformando una muestra integrada de 6 submuestras en ambos casos. Tanto las muestras de mezcla inicial como las de compost maduro se secaron en una estufa de aire forzado a 60ºC y se trituraron para su homogeneizado. Se realizó un análisis multirresiduo estandarizado en el que se analizan 323 materias activas y metabolitos entre las que se incluyen 112 herbicidas, 94 insecticidas, 87 fungicidas, 17 acaricidas, 9 reguladores del crecimiento, 1 raticida y 3 catalogados como “otros”. Todas las determinaciones analíticas de plaguicidas se realizaron por triplicado mediante métodos cromatográficos, utilizando cromatografía de gases (CG) y de líquidos (CL) ambas con detección por espectrometría de masas. Los plaguicidas contenidos en la muestra se extrajeron con acetonitrilo y se identificaron y cuantificaron mediante inyección en un cromatógrafo de GC-QqQ (de triple cuadrupolo) y LC-QqQ. Se realizó una comparación de sus tiempos de retención, con respecto a un patrón de dichos plaguicidas inyectado con anterioridad. Los datos obtenidos se contrastaron con librerías de espectros correspondientes a dichos compuestos. Finalmente, la concentración del plaguicida se determinó por interpolación de su área en la curva de calibrado de concentraciones conocidas de dicho plaguicida, tal como se indica en la norma *UNE-EN 15662:2009*.

Tabla 1. Composición de cada uno de los compost analizados.

Referencia Compost	Ingrediente 1	Ingrediente 2	Ingrediente 3	Ingrediente 4	Ingrediente 5
GVA9	Gallinaza	**Alperujo**	Hoja olivo		
GVA13	**Estiércol ovino**	Raspón			
GVA17	Sarmiento	**Estiércol ovino**	Poda		
GVA45	**Estiércol ovino**	Destrío puerro y calabaza	Alperujo	Poda	
GVA48	**Alperujo**	Hoja olivo			
GVA55	Destrío hortícola	Poda de cítrico	**Estiércol equino**		
GVA70	Paja	Estiércol bovino	**Alperujo**		
GVA71	Paja	Estiércol bovino	**Alperujo**		
GVA85	Poda	**Estiércol ovino**			
GVA88	Carrizo	**Gallinaza**			
GVA89	Carrizo	**Estiércol ovino**			
GVA90	Gallinaza	**Alperujo**	Hoja olivo		
GVA91	Gallinaza	**Alperujo**	Hoja olivo		
GVA92	**Gallinaza**	Raspón			
GVA93	**Gallinaza**	Poda			
GVA94	**Gallinaza**	Raspón			
GVA96	**Gallinaza**				
GVA97	**Gallinaza**	Alperujo			
GVA98	**Gallinaza**	Alperujo	Poda		
GVA99	**Estiércol ovino**	Raspón			
GVA80	**Estiércol ovino**	Raspón			
GVA106	Estiércol equino	**Alperujo**	Raspón		
GVA116	**Estiércol ovino**	Raspón			
GVA120	Sarmiento	Estiércol ovino	**Dieta agotada**		
GVA133	**Estiércol ovino**	Hoja olivo	Romero	Manzanilla	Orégano

Resultados y Discusión

En las mezclas iniciales se han detectado 42 materias activas, lo que supone la ausencia de 281 sustancias potencialmente detectables. Entre las materias activas encontradas en mezcla inicial se detectaron 28 fungicidas, 11 insecticidas y 3 herbicidas. Estos valores representan el 32,2% de los fungicidas analizados, el 11,7% de los insecticidas y el 2,7% de los herbicidas potencialmente detectables. Entre las 25 mezclas iniciales 21 de ellas contenían una o más de estas materias activas. En las mezclas de compost maduro se detectaron 33 materias activas, lo que supone la ausencia de 290 sustancias potencialmente detectables. Entre las materias activas encontradas en compost maduro se detectaron 24 fungicidas, 9 insecticidas y no se detectó ningún herbicida. Estos valores representan la detección del 27,6% de los fungicidas, el 9,6% de los insecticidas y el 0% de los herbicidas potencialmente detectables. Entre las 25 mezclas de compost maduro, 21 de ellas contenían una o más de estas materias activas.

Presencia y eliminación de herbicidas en mezcla inicial y compost maduro

En las muestras de mezcla inicial tan solo se encontraron una o más materias activas de tipo herbicida en 4 de los 25 procesos analizados (16%), lo que supone que un 84% de las mezclas iniciales

estudiadas se encuentra libre de sustancias herbicidas. De las 112 materias activas con efecto herbicida analizadas tan solo se detectaron 3 materias activas en las mezclas iniciales. Estos resultados permitirían afirmar bien la ausencia o bien la presencia por debajo del límite de detección de 109 materias activas de tipo herbicida en las materias iniciales para compostaje orientado a agricultura ecológica. La ausencia del 97,3% de las materias activas analizadas tipo herbicidas y su baja incidencia muestra un escenario inicial con baja presencia de herbicidas en las materias primas utilizadas para el compostaje y los entornos de producción ecológica estudiados.

Tabla 2. Presencia y concentración acumulada de las materias activas herbicidas encontrados en muestra inicial n= nº de compost en los que se ha detectado la presencia de esa sustancia activa.

Familia	Materia activa	Detección en muestra inicial	Cantidad inicial acumulada (µg/kg)	Presencia mezcla inicial (n)
Ácidos Fenoxi-carboxílicos	MCPA	SI	687	3
Difenil-éteres	Oxifluorfen	SI	27	1
Ureas	Linuron	SI	24	1

En las muestras de compost maduro no se encontraron materias activas de tipo herbicida en ninguno de los 25 procesos analizados, lo que supone que el 100% de los compost finales analizados se encontraba libre de plaguicidas con efecto herbicida**.**

Presencia y eliminación de insecticidas en mezcla inicial y compost maduro

En las mezclas iniciales (M1) tan solo se encontró una o más materias activas de tipo insecticidas en 15 de los 25 procesos analizados, lo que supone que un 40% de las mezclas estudiadas se encuentra libre de sustancias insecticidas. De las 94 materias activas con efecto insecticida analizadas tan solo se encontraron 11 materias activas en las mezclas iniciales. Estos resultados permitirían afirmar bien la ausencia o bien la presencia por debajo del límite de detección de 83 materias activas de tipo insecticida potencialmente detectables mediante el análisis estandarizado multirresiduos. Este valor representa tan solo el 11,7% de las materias activas analizadas y sugiere un escenario con baja presencia de insecticidas en las materias primas utilizadas.

Tabla 3. Presencia y concentración acumulada de las materias activas insecticidas encontrados en muestra inicial.

Familia	Materia activa	Detección en muestra inicial	Concentración inicial acumulada (µg/kg)	Presencia muestra inicial (n)
Neonicotinoides	*Imidacloprid*	SI	404	7
Organofosforados	*Clorpirifos*	SI	1.107	4
Organoclorados	*DDT (p,p-DDE)*	SI	34	3
	DDT (suma de p,p´-DDT, o,p´-DDT, p,p´-DDE y p,p´-TDE (DDD) expresados en DDT)	SI	34	3
Benzoilureas	*Lufenuron*	SI	20	1
	Triflumuron	SI	2.600	3
	Diflubenzuron	SI	25	1
Piridinas	*Piriproxifen*	SI	34	2
Piretroides	*Ciflutrin*	SI	220	1
	Cipermetrina	SI	180	1
Carboxamidas	*Hexitiazox*	SI	19	1

Entre las materias activas detectadas las benzoilureas se muestran como las más abundantes ya que el 56,5% de la concentración acumulada corresponde a este subgrupo químico, el 23,7% corresponde a insecticidas organofosforados, el 8,7% a neonicotinoides, el 8,6% a piretroides y el resto de porcentaje se divide entre los grupos químicos de organoclorados, piridinas y carboxamidas con unos porcentajes de 1,4%, 0,7% y 0,4% respectivamente. En la tabla 3 se muestran las materias activas agrupadas por familia, su concentración inicial acumulada y el número de veces que ha aparecido (n).

En las muestras de compost maduro (tal como se aplica en agricultura) tan solo se encontraron materias activas de tipo plaguicida en 17 de los 25 procesos analizados, lo que supone que el 32% de los compost finales analizados se encontraba libre de plaguicidas con efecto insecticida. De las 94 materias activas con efecto insecticida analizadas tan solo se encontraron 9 materias activas en las muestras de compost maduro (triflumuron, clorpirifos, imidacloprid, ciflutrin, cipermetrina, bifentrina, DDT (p,p-DDE), DDT (suma de p,p´-DDT, o,p´-DDT, p,p´-DDE y p,p´-TDE (DDD) expresados en DDT) y clorantraniliprole (dpx e-2y45)). De la misma manera que ocurría en las mezclas iniciales, en este caso las benzoilureas también son las más abundantes con el 44,6% de la concentración acumulada. En los compost maduros el 15,7% de las materias activas detectadas corresponde a una nueva familia, las diamidas, que no se detectó en las mezclas iniciales (proceso de bioconcentración). En los compost maduros el 12,6% y el 12,3 % pertenecen a neonicotinoides y piretroides respectivamente, el 8,7% corresponde a insecticidas organoclorados y el 6,1% a organofosforados. En la tabla 4 se muestran las materias activas encontradas en compost maduro (M3) y su cantidad acumulada final, así como el número de veces que ha sido detectada cada una de ellas, ordenadas por frecuencia de aparición.

Tabla 4. Presencia y concentración acumulada de las materias activas en las muestras de compost final.

Familia	Materia activa	Detección en muestra final	Cantidad total acumulada (µg)	Presencia en muestra final (n)
Benzoilureas	*Triflumuron*	SI	1.087	6
Organofosforados	*Clorpirifos*	SI	150	6
Neonicotinoides	*Imidacloprid*	SI	307	5
Piretroides	*Ciflutrin*	SI	178	5
	Cipermetrina	SI	105	3
	Bifentrina	SI	16	1
Organoclorados	*DDT (p,p-DDE)*	SI	106	5
	DDT (suma de p,p´-DDT, o,p´-DDT, p,p´-DDE y p,p´-TDE (DDD) expresados en DDT)	SI	106	5
Diamidas	*Clorantraniliprole (dpx e-2y45)*	SI	383	2

A nivel de concentración acumulada de cada familia o grupo químico, en la figura 2 se muestra la concentración acumulada inicial y final. Se puede observar como la concentración acumulada inicial de piridinas y carboxamidas se reduce completamente tras el compostaje (escenario A1), las concentraciones acumuladas de benzoilureas, piretrinas y piretroides, neonicotinoides y organofosforados se reducen de forma parcial (escenario A2), mientras que las concentraciones de organoclorados y diamidas sufren un aumento (escenarios A3 y B1), lo que indicaría que las materias primas se degradan más rápidamente que los contaminantes (Hellström et al., 2011)

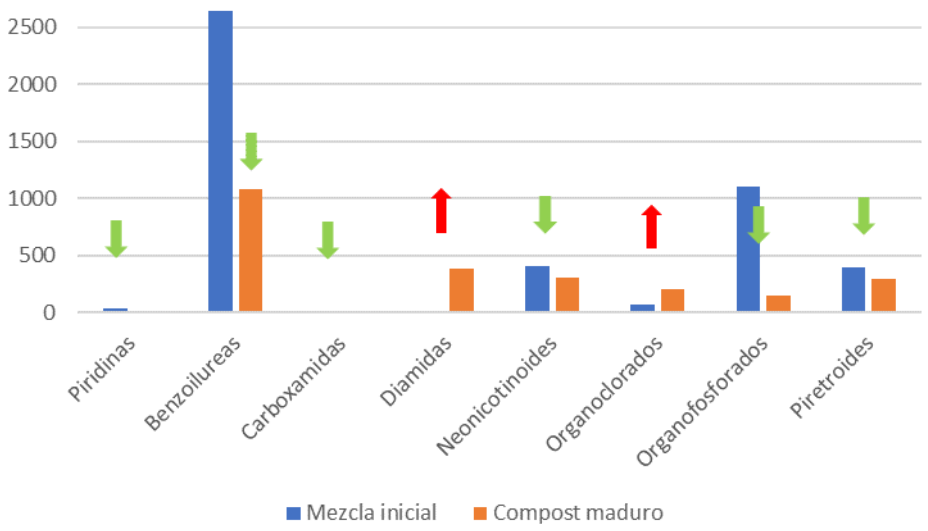


Figura 2. Comportamiento durante el compostaje de las diferentes familias y grupos quimicos detectados

En cada una de las familias las materias activas tienen, a su vez, comportamientos variables de eliminación total, parcial o concentración. La tabla 5 muestra la variabilidad en el comportamiento de cada materia activa durante el proceso de compostaje indicándose para cada escenario la biodegradación o concentración promedio y la desviación estándar correspondiente.

Tabla 5. Comportamiento durante el proceso de compostaje.

Familia	Materia activa	Evolución	Escenarios	Desaparición/ Concentración promedio (%)	Desviación estándar
Neonicotinoides	Imidacloprid	Variable	A1, A2	+83	36,12
			A3	-285	-157,60
Organofosforados	Clorpirifos	Variable	A1, A2	+93	9,99
			B1	-837	-72,93
Organoclorados	DDT (p,p-DDE)	Variable	A1	+100	0
			A3, B1	-530	-139,94
Benzoilureas	Lufenuron	Desaparición	A1	+100	0
	Triflumuron	Variable	A1, A2	+76	21,39
			B1	-12.180	-31,85
	Diflubenzuron	Desaparición	A1	+100	0
Piridinas	Piriproxifen	Desaparición	A1	+100	0
Piretroides	Bifentrina	Concentración	B1	-742	0
	Ciflutrin	Variable	A2	+84	0
			B1	-1.768	-70,45
	Cipermetrina	Variable	A2	+51	-50,66
			B1	-353	0
Carboxamidas	Hexitiazox	Desaparición	A1	+100	0
Diamidas	Clorantranili-prole (dpx e-2y45)	Concentración	B1	-9.979	-87,24

Del estudio de los resultados obtenidos en mezclas iniciales, los compost maduros y el rol del compostaje observado en los diferentes grupos químicos de tipo insecticida permitiría realizar las siguientes afirmaciones:

El porcentaje de materias activas encontradas en las mezclas iniciales frente a las potencialmente detectables ha sido bajo (11,7%) encontrándose en mayor cantidad triflumuron y clorpirifos y con mayor frecuencia imidacloprid y clorpirifos. El porcentaje de materias activas encontradas en los compost maduros frente a las potencialmente detectables ha sido bajo (9,6%) encontrándose en mayor cantidad triflumuron y clorantraniliprole y con mayor frecuencia triflumuron y clorpirifos. Se ha constatado el rol del compostaje en la eliminación de piriproxifen, hexitiazox, lufenuron y diflubenzuron. Se ha constatado el rol del compostaje en el aumento de la concentración de DDT, clorantraniliprole y bifentrina evidenciado el carácter recalcitrante de estas materias activas. Finalmente, algunas materias activas (imidacloprid, clorpirifos, triflumuron, ciflutrin y cipermetrina) presentan comportamientos variables en los diferentes procesos dificultando la definición del rol del compostaje en su eliminación.

Conclusiones

Del análisis de este trabajo se puede deducir la práctica inexistencia de herbicidas e insecticidas en los insumos utilizados de forma habitual por los operadores de agricultura ecológica. Del total de 112 materias activas de tipo herbicida, 94 de tipo insecticida y 87 fungicidas potencialmente detectables en las 25 mezclas iniciales, tan solo se han detectado 3 materias activas herbicidas, 11 insecticidas y 28 fungicidas. No se ha detectado ninguna sustancia activa de tipo acaricida, regulador del crecimiento o raticidas. Del total de 112 materias activas de tipo herbicida, 94 de tipo insecticida y 87 fungicidas potencialmente detectables en los 25 compost maduros, tan solo se detectaron 9 materias activas de tipo insecticida y 24 fungicidas. No se encontró ninguna materia activa de tipo herbicida, acaricida, regulador del crecimiento o raticida.

Se evidencia el potencial del compostaje para la disminución de la contaminación por plaguicidas exceptuando las materias activas más recalcitrantes, como los organoclorados. Serían necesarias más investigaciones para determinar si otros factores del proceso de compostaje como pH, contenido en materia orgánica inicial, relación C/N pueden explicar la variabilidad en cuanto a los distintos comportamientos encontrados.

El desarrollo de protocolos de agrocompostaje controlados adecuadamente ha permitido la eliminación completa de los herbicidas detectados inicialmente y de 4 de los insecticidas presentes en inicio evidenciando la importancia del rol del compostaje y el control del proceso.

Visto el rol del proceso de compostaje en la eliminación se recomienda someter a los insumos agrícolas externos de naturaleza orgánica (estiércoles, restos de cosecha, subproductos de la industria agroalimentaria) a un proceso de agrocompostaje controlado antes de incorporarlos de nuevo al suelo o introducirlos en el entorno agroecológico como enmienda fertilizante, llevando especial atención con los insumos en los que se haya podido utilizar una materia activa más recalcitrante.

Agradecimientos

El presente trabajo se desarrolla gracias al Convenio de Colaboración sobre Agrocompostaje entre la Generalitat, a través de la Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural y La Universidad Miguel Hernández de Elche para la ejecución de proyectos de investigación y experimentación en compostaje.

Bibliografía

Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Revel, JC., 2005. Destino de los hidrocarburos aromáticos policíclicos durante el compostaje de lodos de depuradora de lagunas. Chemosphere, 58, págs. 449 – 458.

Azevedo, A.S.O.N., 1998. Assessment and simulation of atrazine as influences by drainage and irrigation. An interface between RZWQM and ArcView GIS. Doctor Thesis. Iowa State University, Ames, Iowa.

Barbera, J., Omenat, A., Serrano, J. L., & Sierra, T., 1989. New dimeric liquid crystals with chiral flexible spacers. Liquid Crystals, 5(6), 1775-1782

Barker, A., Bryson G.M., 2002. Biorremediación de metales pesados y sustancias tóxicas orgánicas mediante compostaje ", The Scientific World Journal, vol. 2.

Brewer, B. J., 1979. Aging of the rotator cuff. The American journal of sports medicine, 7(2), 102-110.

Hellström, A., Nilsson, M. L., & Kylin, H. 2011. Current-use and organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in the biodegradable fraction of source separated household waste, compost, and anaerobic digestate. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 86(1), 60-64.

Hermosín, M. C., 2011. Agricultura y plaguicidas.

Pakou, C., Kornaros, M., Stamatelatou, K., & Lyberatos, G., 2009. On the fate of LAS, NPEOs and DEHP in municipal sewage sludge during composting. Bioresource Technology, 100(4), 1634-1642.

Pitarch Arquimbau, M. E., 2001. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas. Universitat Jaume I.

Rao, N., Grethlein, H.E., and Reddy, C.A., 1996. Effect of temperature on composting of atrazine-amended lignocellulosic substrates. Compost Sci. Util. 4(3), 83–88.

Semple, K. T., Reid, B. J., & Fermor, T. R., 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environmental pollution, 112(2), 269-283.

Sikora, L.J., 1998 Benefits and drawbacks to composting organic by-products. In Beneficial Co-utilization of Agricultural, Municipal, and Industrial By-products. Brown, S., Angle, J.S., and Jacobs, L., Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 69–77

Silva, V., Mol, H. G., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., & Geissen, V., 2019. Pesticide residues in European agricultural soils–A hidden reality unfolded. Science of the Total Environment, 653, 1532-1545.

Weed, D.A.J., Kanwar, R.S., and Salvador, R.J., 1999. A simple model of alachlor dissipation. J. Environ. Qual. 28, 1406–1412.

Williams, R.T. and Keehan, K.R., 1993. Hazardous and industrial waste composting. In Science and Engineering of Composting. Hoitink, H.A.J. and Keener, H.M., Eds. Renaissance Press, Worthington, OH. pp. 363–382.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Valorización de residuos de la industria agroalimentaria mediante compostaje

C. Álvarez[1], M.D. Pérez-Murcia[2], R. Moral[2], J.A. Pascua1[1], M. Ros[1], C. Egea-Gilabert[3], J.A. Fernández[3] y M.A. Bustamante[2]

[1] Dpto. Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, Apartado 164, 30100 Murcia.
[2] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, EPS-Orihuela, Ctra. Beniel Km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante. E-mail: marian.bustamante@umh.es
[3] Dpto. Ingeniería Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena

Resumen

La industria agroalimentaria ha incrementado su producción en los últimos años, llegando a ser una de las principales industrias generadoras de residuos y subproductos orgánicos susceptibles de aprovechamiento. La correcta gestión y valorización de este tipo de residuos orgánicos es de especial importancia tanto ambiental como económicamente. El objetivo de este estudio es optimizar la gestión de estos residuos orgánicos mediante su valorización por compostaje. Para ello, se prepararon tres mezclas con diferentes proporciones de residuos agroalimentarios, realizando en dichas mezclas un control sobre los parámetros indicativos del proceso de compostaje, así como la caracterización de los compost finales obtenidos. De esta manera, se propone la proporción de residuos más adecuada con la finalidad de obtener un producto final de alto valor añadido con propiedades físico-químicas, químicas y biológicas adecuadas tanto para su producción a gran escala, así como para su uso agrícola.

Palabras clave: residuo agroalimentario, residuo de puerro, residuo de gazpacho, alperujo, calidad de compost.

Valorization of wastes from the agri-food industry through composting

Abstract

The agri-food industry has increased its production in recent years, becoming one of the main industries that generates organic wastes and by-products with a potential value. The suitable management and recovery of this type of organic wastes is a key environmental and economic issue. The aim of this study is to optimize the management of these organic wastes through their recovery by composting. For this, three composting mixtures were prepared with different proportions of agri-food organic wastes. During the process, parameters indicative of the composting process were monitored and the final composts were characterized. The results obtained show the most appropriate proportion of agri-food wastes to obtain high added-value end-products with physico-chemical, chemical and biological properties suitable for both large-scale production and agricultural use.

Keywords: agri-food waste, leek waste, tomato soup waste, olive mill waste, compost quality.

Introducción y/o Justificación

La industria agroalimentaria engloba aquellas empresas o actividades en las que se produce una transformación de las materias primas agrícolas o ganaderas, incorporando en el proceso un valor añadido y dando lugar a productos elaborados o semielaborados (Moreno y col, 2015). Ha sido y es uno de los principales motores de crecimiento de la economía mundial, y juega un importante papel en la economía de la Comunidad Valenciana. Dada la importancia del sector, es importante destacar la gran cantidad de residuos que genera, concentrados en la generación de grandes cantidades de aguas residuales con alta carga orgánica, nutrientes y sólidos en suspensión, y por otra parte la generación de residuos sólidos, biodegradables y no peligrosos, susceptibles de aprovechamiento mediante la aplicación de diversas tecnologías, como puede ser el compostaje, y por tanto utilizados como materia prima para cualquier otra actividad. La búsqueda de soluciones que permitan minimizar el impacto ambiental derivado de este tipo de industrias pasa por la necesidad de buscar una salida sostenible a los residuos que generan, priorizando minimizar la eliminación y destinando cualquier residuo biodegradable hacia la valorización y el reciclaje según viene marcado por la jerarquía en la gestión de residuos (Moreno y col, 2015). Por ello, se propone la técnica de compostaje como aquella capaz, por un lado, de gestionar de manera sostenible este tipo de residuos y, por otro lado, de introducir el concepto de Economía Circular en un sector de importancia mundial, como es el agroindustrial. El compostaje consiste en la degradación de la materia orgánica presente en los residuos mediante su oxidación y la acción de diversos microorganismos presentes en los propios residuos. Los principales objetivos del compostaje son la estabilización de la materia orgánica y la higienización, mediante la eliminación de patógenos y de malas hierbas, así como la reducción del peso y volumen de los materiales a compostar, de modo que el producto final obtenido, nos reporte los diferentes beneficios sobre suelo, plantas, economía y medioambiente (Moreno y Mormeneo, 2008).

El compost es el producto final del proceso de compostaje, formado por materia orgánica estabilizada semejante al humus, inocuo y libre de sustancias fitotóxicas, cuya aplicación al suelo no provocará daños a las plantas, y que permitirá su almacenamiento sin posteriores tratamientos ni alteraciones (Moreno y col., 2015). Para que un compost sea considerado como tal, se deben cumplir determinados requisitos en cuanto a producto estabilizado, libre de patógenos, que debe haber sido sometido a una etapa de descomposición inicial y que será el resultado de un proceso de humificación. La calidad final de un compost dependerá de factores como el material inicial utilizado, las condiciones del proceso de compostaje y del almacenamiento final de producto y se deberá realizar una evaluación detallada de una serie de parámetros específicos antes de su comercialización que nos permita establecer la mejor aplicación del compost, ya sea como enmienda orgánica, medio de cultivo o componente de sustratos. Los parámetros a controlar son las propiedades físicas, químicas y biológicas, marcadas por la legislación vigente, que nos permiten conocer el comportamiento del compost según la aplicación elegida y evitar los efectos negativos graves derivados de la aplicación de un compost sin un grado de madurez adecuado. Adicionalmente, los residuos orgánicos generados en el sector agroalimentario constituyen unos materiales iniciales muy adecuados para obtener compost de alta calidad y valor añadido, al no contener compuestos o elementos tóxicos, como los metales pesados (Morales y col., 2016). Por otra parte, también pueden presentar otras características (adecuadas propiedades físicas y/o la potencial capacidad supresora frente a fitopatógenos) que pueden proporcionar un valor añadido al compost (Morales y col., 2016).

Por tanto, en este trabajo experimental se plantea como objetivo principal el estudio de la valorización de residuos procedentes de la industria agroalimentaria y diferentes restos vegetales, mediante compostaje en pila móvil con ventilación natural y con volteos periódicos, con la finalidad de obtener un producto final estabilizado, altamente humificado y con valor añadido.

Material y Métodos

Diseño de las mezclas de compostaje y seguimiento del proceso

Para la elaboración de las tres pilas de compostaje se utilizaron los siguientes residuos orgánicos procedentes de la industria agroalimentaria: residuo de gazpacho, alperujo, residuo de puerro y poda de vid, este último residuo como agente estructurante. Los residuos iniciales mostraron valores de pH ligeramente ácidos entre 5,1 y 6,1, bajos valores bajos de conductividad eléctrica (CE), excepto el residuo de puerro (CE = 9.95 dS/m) y altos contenidos en materia orgánica (MO), especialmente los residuos de gazpacho y poda de vid (Tabla 1). En la Tabla 2 se muestran las proporciones respecto a peso seco de cada uno de los materiales iniciales utilizados.

Las pilas de compostaje, con unas dimensiones aproximadas de 5 m de longitud, con base máxima de 2,5 m y altura de 1,3 m, se prepararon en la planta piloto de compostaje (Compolab) de la Universidad Miguel Hernández (Orihuela, Alicante). Las pilas tuvieron como fuente de humedad inicial, así como para los riegos posteriores, agua potable procedente de la red de abastecimiento, siendo estos riegos realizados una vez a la semana durante la etapa termófila y cada 15 días durante el resto del proceso, siempre intentando mantener una humedad superior al 40%.

Tabla 1. Caracterización de los materiales iniciales.

	H (%)	DA (kg/L)	pH	CE (dS/m)	MO (%)	COT (%)	N (%)	C/N
RG	76,5	0,457	5,2	3,37	94,1	52,6	2,99	17,6
A	65,2	1,048	5,1	4,51	89,9	51,7	1,49	34,7
RP	89,5	0,459	6,0	9,95	78,6	40,3	2,50	16,1
PV	10,3	0,127	6,1	1,33	93,9	46,7	0,63	74,1

RG: residuo gazpacho; A: alperujo; RP: residuo de puerro; PV: poda de vid. H: humedad; DA: densidad aparente; CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; COT: carbono orgánico total.

Para controlar las condiciones del proceso, se dispuso de volteadora, sondas de temperatura conectadas a un data logger (HOBO®U12) que registraba los datos cada 2 h y sistema de riego. Se consideró finalizada la fase bio-oxidativa del proceso una vez se alcanzó una temperatura próxima a la del ambiente y se comprobó que no hubo reactivación tras el volteo. La duración de la fase bio-oxidativa fue de 146 días para la pila 1 y de 165 días para las pilas 2 y 3. A continuación, se quitaron las sondas de temperatura y las pilas de compost se dejaron madurar los compost durante 50 días.

Tabla 2. Proporción de los residuos utilizados en las mezclas.

Mezclas	Composición respecto al peso seco (peso fresco entre paréntesis)
Pila 1	45% poda de vid + 21% puerro + 34% alperujo (14,7:57,3:28)
Pila 2	42% poda de vid + 25% resto de gazpacho + 33% alperujo (18,8: 42,2:38,8)
Pila 3	41% poda de Vid + 21% resto de gazpacho + 8% puerro + 30% alperujo (15,4:29,8:25,6:29,2)

Métodos analíticos y estadísticos

En las muestras de los materiales iniciales y las muestras de compostaje se analizó el pH, la conductividad eléctrica, la materia orgánica, el carbono orgánico total (COT) y el nitrógeno total (NT) según los métodos descritos por Morales y col. (2016). En los compost maduros, adicionalmente se determinaron el P, K, Na, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y el índice de germinación, mediante los métodos utilizados por Bustamante y col. (2012). Todos los análisis se realizaron por

triplicado. Las pérdidas de materia orgánica se calcularon a partir del contenido de cenizas inicial (X1) y en el punto de estudio (Xn), de acuerdo con la ecuación de Viel y col. (1987):

$$\text{Pérdidas MO (\%)} = 100 - 100[X1(100 - Xn)/Xn(100 - X1)]$$

Esta ecuación representa el porcentaje de materia orgánica perdida con respecto a la cantidad inicial, para ello se considera que el contenido de cenizas a lo largo del proceso es constante y de este modo se evita el efecto concentración provocado por las pérdidas de peso de la pila debidas a la degradación de la materia orgánica. Los datos así obtenidos se modelizaron con la siguiente ecuación cinética de primer orden:

$$\text{Pérdidas MO} = A\,(1\text{-}e^{-kt})$$

El tratamiento estadístico aplicado a los datos obtenidos se realizó mediante un análisis estadístico ANOVA de una sola vía, que permitiera evaluar si la evolución a lo largo del proceso de compostaje fue significativa. En los parámetros en los que se estudió la evolución en las 4 etapas del proceso de compostaje, el contraste post-hoc realizado fue la diferencia mínima significativa (DMS o sus siglas LSD en inglés).

Resultados y Discusión

Perfil térmico de las pilas de compostaje

En la Figura 1 se muestra la evolución de la temperatura en cada una de las pilas durante el proceso de compostaje con respecto a la temperatura ambiente, así como los volteos, riegos y muestreos realizados. La evolución de la temperatura es un parámetro importante a la hora de interpretar y controlar el proceso de compostaje, ya que el incremento de la actividad de los microorganismos encargados del proceso se traduce en el aumento de la temperatura por la generación de calor y por ello se considera la temperatura un buen indicador de la actividad microbiana (Bustamante y col., 2012). Se observó una buena evolución de la temperatura durante todo el proceso, alcanzando temperaturas superiores a los 50ºC desde el inicio de la mezcla. En las pilas 2 y 3, se observaron temperaturas más altas que superaron los 70ºC, indicando el efecto de los residuos de gazpacho en la fase termofílica de estas mezclas que asegura la eliminación de posibles patógenos durante el proceso, al verificar el criterio establecido a nivel europeo como requisito para asegurar la correcta higienización de la mezcla (European Commission, 2014). La duración de la fase bio-oxidativa en todas las pilas fue larga (146 días en la pila 1 y 165 para las pilas 2 y 3), lo cual nos muestra el efecto del alperujo sobre esta fase, alargándola más que otros residuos agroindustriales y asegurando así una buena higienización de las mezclas. Este hecho también fue observado por Paredes y col. (2002) en un experimento de compostaje con lodos de alpechín.

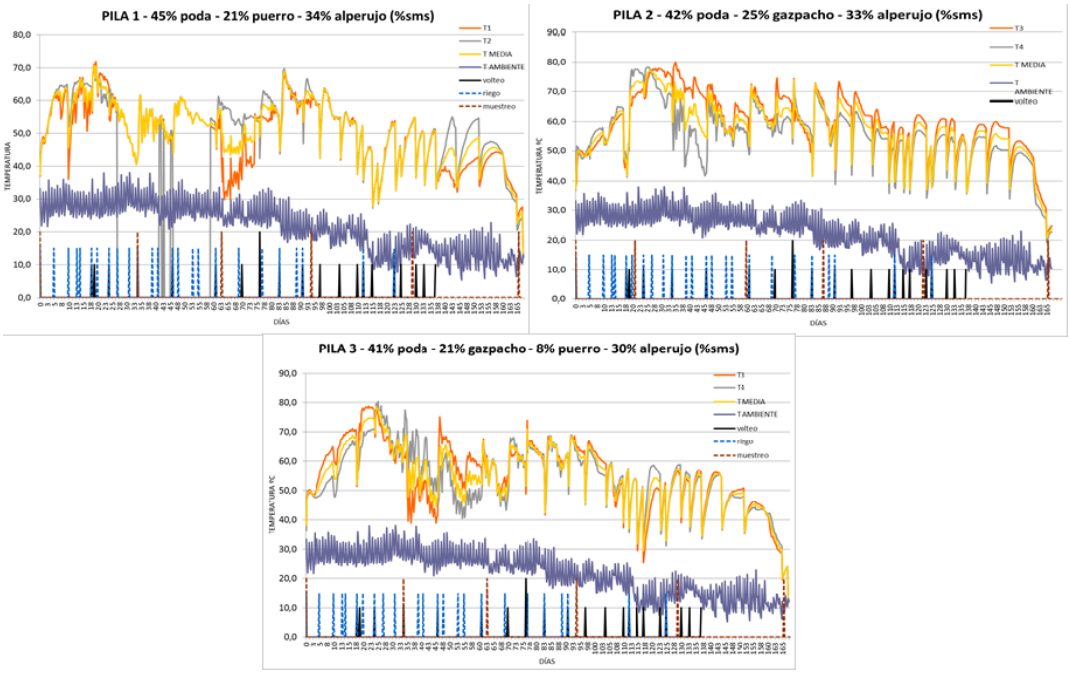


Figura 1. Perfiles térmicos de las Pilas 1, 2 y 3 respecto a la temperatura ambiente.

Evolución de los parámetros físico-químicos durante el compostaje

En la Figura 2 se muestra la evolución del pH y la conductividad eléctrica (CE) en las pilas de compostaje. El pH es otro de los parámetros indicativos de la evolución del proceso de compostaje que generalmente sufre diversas variaciones a lo largo del proceso (acidificación inicial, aumento intermedio y disminución final) (Bustamante y col, 2012). Los resultados obtenidos para el pH nos indican como este parámetro se vio influido tanto por la proporción de materiales iniciales como por el tiempo de compostaje. Los valores iniciales de pH fueron ligeramente ácidos o próximos a la neutralidad, con valores inferiores a 6,5, estando estos valores para las tres pilas dentro del intervalo adecuado para el desarrollo de las bacterias y hongos que degradan la materia orgánica durante el proceso de compostaje (Moreno y Mormeneo, 2008). A medida que avanzó el proceso de compostaje se produjo un incremento del valor de pH en cada pila, lo que es indicativo de un correcto desarrollo del proceso, tal como observaron Bustamante y col. (2012) en un experimento de compostaje de residuos de la industria vinícola y alcoholera.

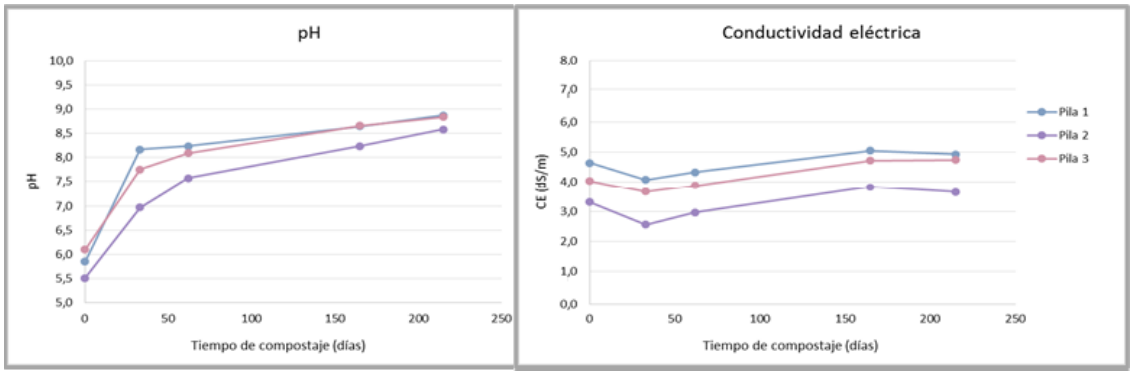


Figura 2. Evolución del pH y la CE durante el proceso de compostaje. (pH: LSDpila1 = 0,08; LSDpila2 = 0,05; LSDpila 3 = 0,07); (CE: LSDpila1 = 0,11; LSDpila2 = 0,17; LSDpila 3 = 0,21). LSD: diferencia mínima significativa.

Respecto a la CE, en las tres pilas se observó un aumento de este parámetro, especialmente durante la etapa bio-oxidativa, respecto al inicio del compostaje. Esto es debido a la mineralización de la materia orgánica y la liberación de iones durante la degradación (Paredes y col. 2001; Bustamante y col., 2012). Según Lasaridi y col. (2006), el valor de CE en un compost no debe superar los 3 dS m^{-1} para no provocar efectos adversos, valores que pueden reducirse a través de mezclas con otros materiales y/o mediante lavando (Cáceres y col., 2015). En las mezclas estudiadas, la CE de los compost finales superó dicho valor, incluso ya desde el inicio, aunque al no ser un valor muy elevado los compost podrían ser usados como enmienda orgánica, siendo según este parámetro, el compost de la pila 2 el más apropiado como enmienda de los 3 desde el punto de vista de la salinidad.

Evolución de los parámetros químicos durante el compostaje

- **Pérdidas de materia orgánica**

La Figura 3 muestra las pérdidas de materia orgánica (MO) consecuencia de los procesos de mineralización durante el proceso de compostaje. El contenido final del compost en MO dependerá de su valor inicial, de su degradabilidad, así como de la transformación que hayan sufrido sus componentes a lo largo del proceso. Se observó una pérdida de MO más acusada durante la fase bio-oxidativa debido a la intensa actividad microbiana que caracteriza esta etapa (Bustamante y col., 2012). Todas las pilas estudiadas mostraron pérdidas de MO finales por encima del 60%, siendo esta pérdida más acusada en la pila 1 durante la fase termófila. Las pilas 2 y 3 mostraron pérdidas menores que la pila 1, ya que aunque estas pilas alcanzaron mayores temperaturas, tuvieron una mayor duración de la etapa termófila, tal como se ha observado en estudios previos de compostaje de residuos agroindustriales (Morales y col., 2016). Pérdidas considerables de MO durante la fase bio-oxidativa indica estabilidad relativa de los productos después de dicha etapa y por ello, puede ser utilizado como un indicador de la tasa de compostaje (Petric y col., 2012). Adicionalmente, todas las pilas se ajustaron a una ecuación cinética de primer orden, obteniendo mejor ajuste las Pilas 1 y 2 que la Pila 3**,** que mostró una tendencia más lineal (Fig. 3). En estas mezclas la máxima degradación de materia orgánica observada fue similar a los valores encontrados por Paredes y col. (2001) y Bustamante y col. (2012) en estudios de compostaje de residuos orgánicos de origen agroindustrial y urbano.

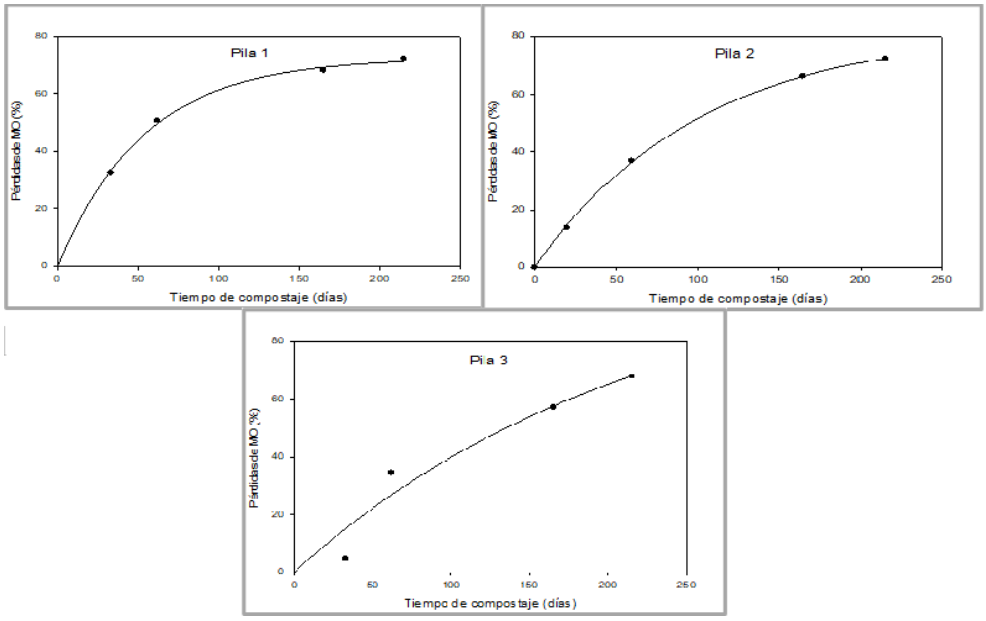


Figura 3: Evolución y modelización de las pérdidas de materia orgánica durante el proceso de compostaje. Las líneas representan el ajuste al modelo cinético de primer orden.

- **Evolución del carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (NT) y relación C/N**

La Figura 4 muestra la evolución del COT, NT y la relación C/N durante el proceso de compostaje. El contenido en COT también se ve afectado por la mineralización que sufre la mezcla a lo largo del proceso de compostaje.

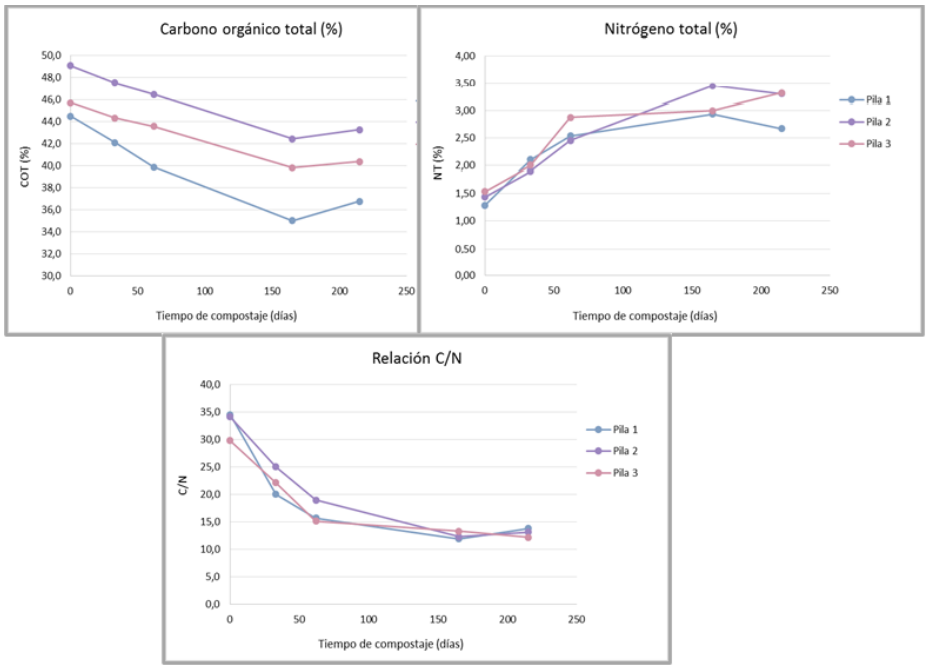


Figura 4. Evolución del COT, NT y Relación C/N durante el proceso de compostaje. (COT: LSDpila 1 = 1,93; LSDpila 2 = 1,23; LSDpila 3 = 1,05); (NT: LSDpila 1 = 0,12; LSDpila2 = 0,41; LSDpila 3 = 0,14); C/N (LSDpila1 = 1,42; LSDpila2 = 1,36; LSDpila 3 = 1,28). LSD: diferencia mínima significativa.

Se observó un mayor descenso de COT durante la fase bio-oxidativa, asociado al incremento de la actividad microbiana y a la mineralización sufrida (Bustamante y col., 2008). Los valores de COT en los compost finales fueron altos, superando el 40% en las pilas 2 y 3, y alrededor de 36% en la pila 1. En las pilas estudiadas, el contenido en NT aumentó por el efecto concentración y la posible fijación biológica de N (Paredes y col., 2002), estando los valores finales por encima del 2,5% y siendo inferiores a los observados en compost elaborados con otros materiales, como los digeridos anaerobios de residuos ganaderos que alcanzaron valores del 3,5% de NT (Bustamante y col., 2012).

Respecto a la relación carbono orgánico respecto al nitrógeno total (COT/NT), en todas las pilas estudiadas se observó una disminución de este parámetro, más acusada durante la etapa bio-oxidativa donde se produce una mayor degradación de la MO. Los valores de la relación COT/NT para las tres pilas quedó comprendida entre 10 y 15 después de la etapa de maduración, confirmando que todos los compost consiguieron un nivel aceptable de madurez, al encontrarse este parámetro por debajo de 20, valor máximo encontrado en la bibliografía para establecer que un compost es maduro (Moreno y col., 2015).

- **Calidad agronómica de los compost obtenidos**

Los compost obtenidos presentaron un pH básico, mostrando el compost 1 el valor más alto (Tabla 4), mientras que la CE y el Na presentaron valores medios, salvo para la pila 1, que presentó los valores más altos. Todos los compost mostraron altos contenidos en MO, siendo superiores al mínimo fijado por la legislación española para compost (RD 506/2013, de fertilizantes) y adecuados contenidos en macronutrientes para su uso agrícola. Respecto a la madurez y estabilidad de los compost obtenidos,

todos mostraron un adecuado grado de madurez y estabilidad, tal como se muestra en los valores de la capacidad de cambio catiónico (CCC), superiores a los valores mínimos establecidos que indican la madurez del compost (CCC > 60-67 meq/100g de MO) (Harada e Inoko, 1980; Iglesias Jiménez y Pérez García, 1992), así como ausencia de fitotoxicidad (IG > 50%) (Zucconi y col., 1981).

Tabla 4. Principales características a nivel agronómico de los compost obtenidos.

Parámetro	Compost 1	Compost 2	Compost 3
pH	8,88	8,59	8,84
Conductividad eléctrica (dS/m)	4,94	3,65	4,75
Materia orgánica total (%)	62,2	75,9	68,6
N total (%)	2,67	3,29	3,31
Relación C/N	12,5	13,2	12,2
P (%)	0,41	0,47	0,49
K (g/kg)	21,9	15,8	20,1
Na (g/kg)	2,10	1,20	1,60
CCC (meq/100g MO)	152	113	138
Índice de germinación (%)	94	77	96

Conclusiones

El proceso de compostaje se ha mostrado como un tratamiento viable para gestionar y valorizar los residuos agroalimentarios, evitando así su depósito en vertedero o cualquier otra práctica que no contemple la posibilidad de utilizarlos como nuevo recurso. Las proporciones de residuos utilizadas en el estudio fueron las adecuadas para alcanzar el rango de temperatura y duración de las etapas del proceso de compostaje necesario para garantizar la adecuada higienización de los compost obtenidos. En general, todos los compost obtenidos mostraron adecuadas propiedades agronómicas (contenido en nutrientes y materia orgánica), un adecuado grado de madurez y ausencia de fitotoxicidad, mostrando el compost 2 las mejores características desde el punto de vista de la salinidad, para su uso como enmienda orgánica en agricultura. Los resultados obtenidos en este estudio abren la posibilidad para la realización de nuevos diseños de compostaje basados en el uso de residuos de la industria agroalimentaria para su adecuada gestión y valorización, así como para el estudio de características adicionales en los compost finales obtenidos que puedan suponer un valor añadido para el posterior uso agrícola de estos materiales, tales como su potencial capacidad biocontrol y/o biofertilizante.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER, "*Una manera de hacer Europa*") en el marco del Proyecto "Obtención y validación de compost como biofertilizante, inductor de resistencia a fitopatógenos y de cualidades saludables en el marco de una producción intensiva sostenible" (Project AGL2017-84085-C3-2-R).

Bibliografía

Boletín Oficial del Estado (BOE). Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. URL: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-7540

Bustamante, M.A., Paredes, C., Marhuenda-Egea, F.C., Pérez-Espinosa, A., Bernal, M.P., Moral, R., 2008. Co-composting of distillery wastes with animal manures: carbon and nitrogen transformations in the evaluation of compost stability. Chemosphere, 72: pp. 551-557.

Bustamante, M.A., Restrepo, A.P., Alburquerque, J.A., Pérez-Murcia, M.D., Paredes, C., Moral, R., Bernal, M.P., 2012. Recycling of anaerobic digestates by composting: effect of the bulking agent used. J. Clean. Prod., 47: pp. 61-69.

Cáceres, R., Coromina, N., Malinska, K., Marfà, O. 2015. Evolution of process control parameters during extended co-composting of green waste and solid fraction of cattle slurry to obtain growing media. Bioresource Technology, 179: 398-406.

European Commission. 2014. End-of-waste critery for biodregadable waste subject to biologil treatment (compost and digestate), EC JRC 87124.

Harada, Y. e Inoko, A. 1980. The measurement of the cation-exchange capacity of composts for estimation of degree of maturity. Soil Sci. Plant Nutr., 26, 127-134.

Iglesias Jiménez, E. y Pérez García, V. 1992. Determination of maturity indices for city refuse composts. Agr. Ecosyst. Environ., 38, 331-343.

Lasaridi, K.; Protopapa, I.; Kotsou, M.; Pilidis, G.; Manios, G.; Kyriacoua, A. 2006. Quality assessment of composts in the Greek market: The need for standards and quality assurance. Journal of Environmental Management, 80: 58-65.

Morales, A.B., Bustamante, M.A., Marhuenda-Egea, F.C., Moral, R., Ros, M., Pascual, J. A., 2016. Agri-food sludge management using different co-composting strategies: study of the added value of the composts obtained. J. Cleaner Prod. 121, 186–197.

Moreno Casco, J.M., Mormeneo, S. 2008. Microbiología y bioquímica del proceso. En: Compostaje, (Eds) Moreno, J. y Moral, R, pp 111-140. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

Moreno, J., Moral, R., García-Morales, J.L., Pascual, J.A., Bernal, M.P., 2015. De residuo a recurso. El camino hacia la sostenibilidad. Residuos orgánicos. Residuos agroalimentarios. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

Paredes, C., Bernal, M.P., Roig, A. And Cegarra, J. 2001. Effects of olive mil wastewater addition in composting of agroindustrial and urban wastes. Biodegradation, 12, 225- 234.

Paredes, C., Bernal, M.P., Roig, A. And Cegarra, J. 2002. Biodegradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. Bioresource Technology 85, 1-8.

Petric I, Helić A, Avdić EA. 2012. Evolution of process parameters and determination of kinetics for co-composting of organic fraction of municipal solid waste with poultry manure. Bioresour Technol 117:107–116.

Viel, M., Sayag, D., Peyre, A. y André, L., 1987. Optimization of in-vessel co-composting through heat recovery. Biol. Wastes, 20: 167-185.

Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. y de Bertoldi, M. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. Biocycle 22: 54–57. NFY Tam, S Tiquia.

Sesión 7:

Instalaciones Industriales y Agrícolas.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Diseño de un velocímetro de banda de rodadura para ensayo de velocidad máxima en ciclomotor de dos ruedas (L1/L1e) en condiciones estáticas

M.M. Paricio-Caño, M. Ferrández-Villena*

Departamento de Ingeniería, Universidad Miguel Hernandez, Ctra. Orihuela-Beniel, km 3.2, 03300 Orihuela; manuel.paricio@itevebasa.com (M.M.P.-C.); m.ferrandez@umh.es (M.F.-V)

* Correspondencia: m.ferrandez@umh.es ; Tel.: +34-966-749-716

Resumen

El ensayo de limitación de velocidad para el vehículo ciclomotor de dos ruedas (categoría L1/L1e: vehículo de dos ruedas con velocidad máxima por construcción ≤ 45 km/h, de cilindrada ≤ 50cm^3 (combustión interna) o potencia continua nominal máxima ≤ 4kW (motores eléctricos)), está procedimentado en la directiva 2006/27/CE. La metodología de ensayo descrita en el citado acto reglamentario está basada en un ensayo dinámico. Por primera vez en España se hace obligatoria la inspección de Limitación de Velocidad en Ciclomotores de dos ruedas (L1/L1e) con motor de combustión interna, tanto de transmisión por caja automática como manual, en el Manual de Procedimiento de Estaciones ITV rev.6ª (05/01/2009) con una metodología basada en un ensayo estático. El citado ensayo estático está descrito con la utilización de un tipo de velocímetro compuesto de dos rodillos libres o de un rodillo libre, en función del diámetro exterior de los mismos. En una fase previa al presente artículo se cuestionó, entre otras variables de influencia al ensayo, y su procedimiento de ejecución, la utilización del citado tipo de velocímetro. Por lo tanto, el objetivo es desarrollar un equipo velocímetro de banda de rodadura con el objeto de simular las mismas condiciones de uso en estático del ciclomotor, que en uso dinámico en carretera.

El velocímetro de banda de rodadura ha sido diseñado, calculado, construido y ensayado con el mismo ciclomotor de dos ruedas automático, dando resultados diferentes a los obtenidos con el velocímetro de dos rodillos libres.

Palabras clave: Velocidad, banda de rodadura, velocímetro, ciclomotor, estático

Design of a tread speedometer for maximum speed test on two-wheel moped (L1 / L1e) under static conditions

Abstract

The Speed Limitation test for the two-wheel Moped vehicle (category L1 / L1e: two-wheel vehicle with maximum construction speed ≤ 45 km / h, displacement ≤ 50cm^3 (internal combustion) or maximum nominal continuous power ≤ 4kW (electric motors)), is set out in directive 2006/27 / CE. The test methodology described in the aforementioned regulatory act is based on a dynamic test. For the first time in Spain, the Speed Limitation inspection on two-wheel Mopeds (L1 / L1e) with internal combustion engine, both with automatic and manual transmission, is mandatory in the ITV Stations Procedure Manual rev.6ª (05/01/2009) with a methodology based on a static test. The aforementioned static test is described with the use of a type of speedometer composed of two free rollers or one free roller, depending on their outer diameter. In a phase prior to this article, the use of the aforementioned type of speedometer was questioned, among other variables influencing the test, and its execution procedure. Therefore, the objective is to develop a tread speedometer equipment in order to simulate the same conditions of use in static use of the moped, as in dynamic use on the road.

The tread speedometer has been designed, calculated, built and tested with the same automatic two-wheel moped, giving different results than those obtained with the two free-roller speedometer.

Keywords: Speed, tread, speedometer, moped, static

Introducción y/o Justificación

La metodología del ensayo de Limitación de Velocidad (Velocidad máxima de fábrica) para el vehículo Ciclomotor de dos ruedas (L1/L1e) está bajo procedimiento en la directiva 2006/27/CE, siendo éste de obligatorio cumplimiento para la obtención de la homologación de Tipo de vehículo (2002/24 - 2005/30/CE). Dicha metodología está basada en un ensayo dinámico. Ésta incluye el control previo de las condiciones del vehículo, condiciones del conductor, características del recorrido, condiciones atmosféricas y procedimiento de ensayo.

En España se hace obligatoria la inspección de la Limitación de Velocidad en Ciclomotores de dos ruedas (L1/L1e) con motor de combustión interna, tanto de transmisión con caja automática como manual, en el Manual de Procedimiento de Estaciones ITV revisión 6ª a partir de la fecha 05/01/2009. La metodología del ensayo, así como la instrumentación a utilizar, se desarrolla en el apartado-capítulo 10.05 de la Sección II del citado Manual, estando basada en un ensayo estático. Esta metodología incluye condiciones de control sobre los dos equipos posibles de inspección (banco de potencia o banco de rodillos libres), condiciones previas del vehículo y procedimiento de ensayo.

El velocímetro de banco de rodillos libres es el único equipo puesto en uso, conocido por el autor del presente, en todas las Estaciones/Unidades móviles de ITV del territorio nacional español en este momento.

Las características mecánicas exigibles a este velocímetro de banco de rodillos libres son:

Diámetro mínimo de los rodillos:

- ✔ • Banco de doble rodillo: 100 mm.
- ✔ • Banco de un solo rodillo: 300 mm.

Resistencia al giro máxima admisible: 0,1 Nm

Momento de inercia máximo del conjunto de rodillos: 1 kg·m^2.

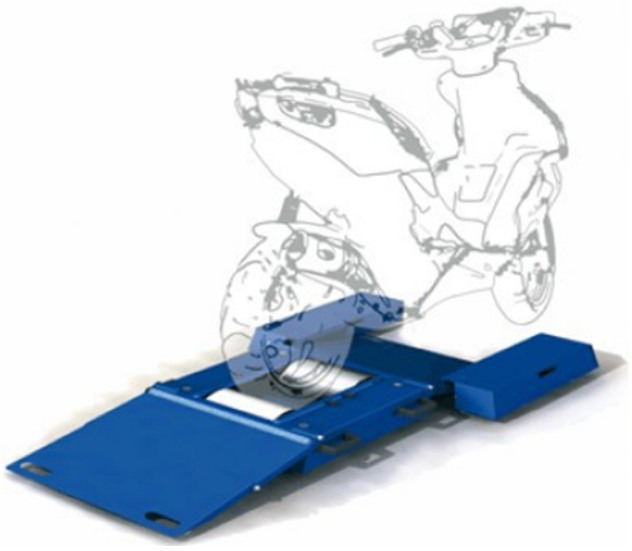


Figura 1. Tipo de velocímetro de 2 rodillos libres (Manual funcionamiento RYME VTC-II).

El objetivo de este artículo es presentar el diseño, cálculo y construcción de un velocímetro de banda de rodadura, que mejor pueda reproducir el comportamiento dinámico del ciclomotor a

ensayo estático de velocidad máxima. Se citarán resultados de ensayos realizados con este nuevo velocímetro.

Material y Métodos

El desarrollo mecánico fundamental del nuevo velocímetro es la eliminación del actual doble apoyo de la rueda tractora del ciclomotor sobre los dos rodillos libres (equipo mayoritariamente utilizado en las Estaciones ITV nacionales), y con ello, intentar simular condiciones de utilización del ciclomotor por vía pública. Para ello, la propuesta de diseño es que el velocímetro disponga de una banda de rodadura para el apoyo de la rueda tractora del ciclomotor.

Los requerimientos técnicos iniciales en fase de diseño del prototipo velocímetro de banda de rodadura serían:

Carga puntual de 250 kg.

Ensayos a una velocidad ≤120 km/h.

Dimensiones comprendidas entre 300 y 500 mm de largo y entre 200 y 350 mm de ancho.

Todos los elementos del conjunto deberán superar un coeficiente de seguridad superior a 2,5 en fatiga.

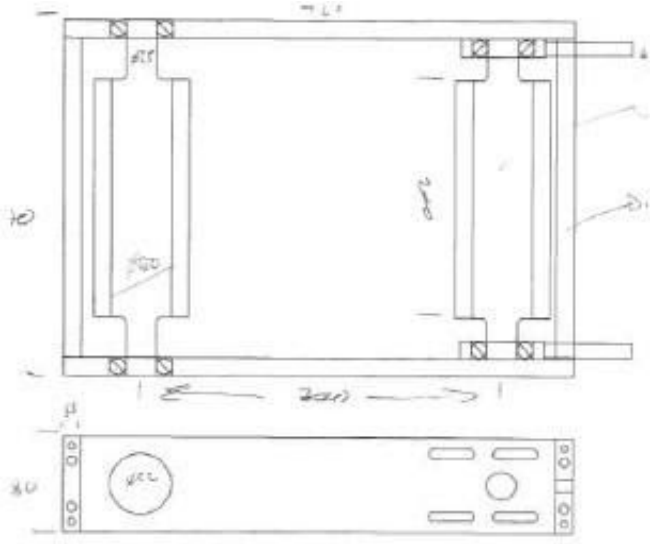


Figura 2. Boceto diseño prototipo velocímetro.

El funcionamiento básico del velocímetro de banda de rodadura sería:

1. Rueda tractora del ciclomotor (L1/L1e) transmite par motor a los rodillos vía contacto-adherencia a la banda de rodadura.
2. El acoplado a un extremo de un rodillo envía velocidad angular del rodillo para su conversión a velocidad lineal.
3. Esa velocidad lineal será con una incertidumbre aceptable la misma velocidad lineal que la rueda tractora.

Los componentes del prototipo serían:

Banda de rodadura.

Estructura soporte rectangular férrica.

Dos rodillos

Un codificador de posición angular.

Cuatro rodamientos.

Cada rodillo irá fijados a la estructura de soporte mediante dos rodamientos que estarán colocados en los extremos de éste. En uno de los rodillos se acoplará un codificador de posición angular en un extremo, para la medición de la velocidad angular de giro.

Los rodamientos de apoyo de los rodillos a la estructura de soporte estarán fijados mediante soportes móviles, para disponer de tensor de la banda de rodadura.

Los cálculos se desarrollan con la aplicación Autodesk Inventor integrando un módulo de elementos finitos (MEF).

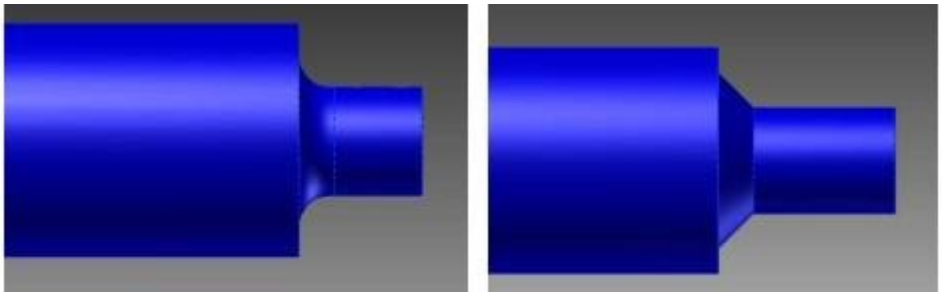


Figura 3. Detalle de tipos de chaflanes previstos en rodillos para disminuir concentración de tensiones.

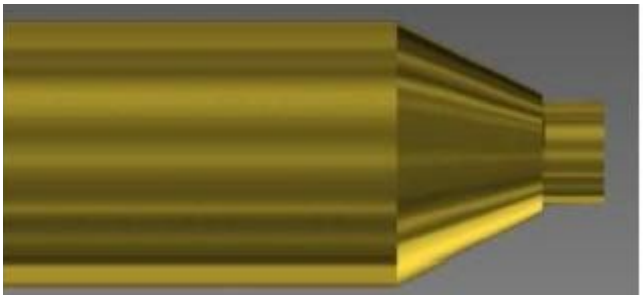


Figura 4. Detalle definitivo de diseño en rodillos para disminuir concentración de tensiones.

Resultados y Discusión

Fase de cálculo

Los requerimientos definitivos exigibles para el prototipo velocímetro de banda de rodadura en la fase de cálculo han sido:

Carga Puntual Máxima centro geométrico (cg) del velocímetro:	175 kg
Velocidad Lineal Máxima de los rodillos:	80 km/h
Flecha máxima de la banda de rodadura en cg del velocímetro:	20mm
Temperatura ambiente máxima de ensayos:	100 ºC
Anchura de la superficie de contacto en banda de rodadura:	200mm

Momento de inercia máximo del conjunto prototipo: 1kg m2

Par resistente máximo del conjunto prototipo: 0,1 Nm

- **Cálculo de rodillos**

Los cálculos de los rodillos se harán con los siguientes requerimientos técnicos:

Cálculo a fatiga por cargas axiales y pares fluctuantes (dinámico).

Minimización de concentración de tensiones por reducciones de sección.

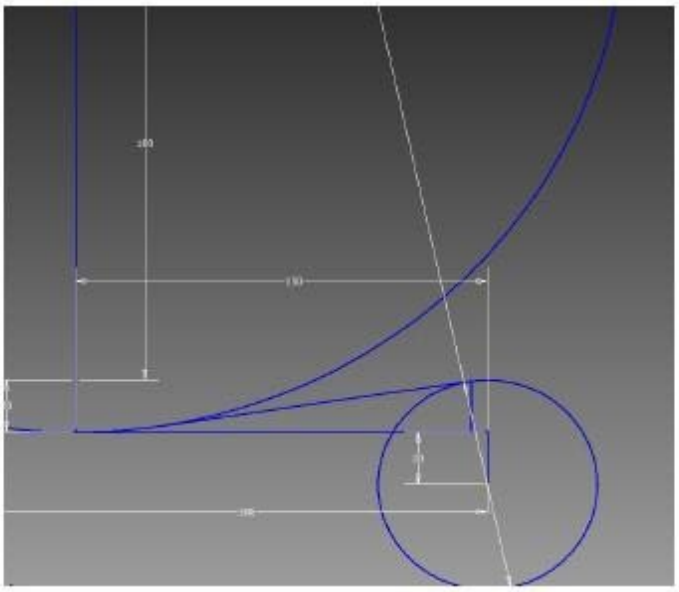


Figura 5. Determinación de ángulo de flecha de la banda de rodadura para análisis de esfuerzos sobre rodillos

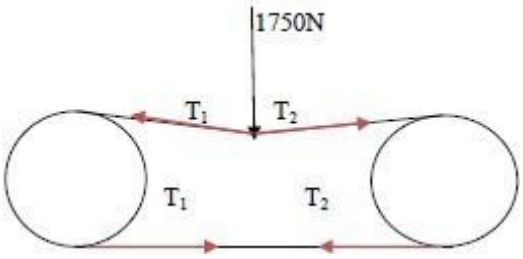


Figura 6. Ángulo resultante de 7,8º.

El material elegido para el cálculo, y posterior construcción de los rodillos es Acero f 1270.

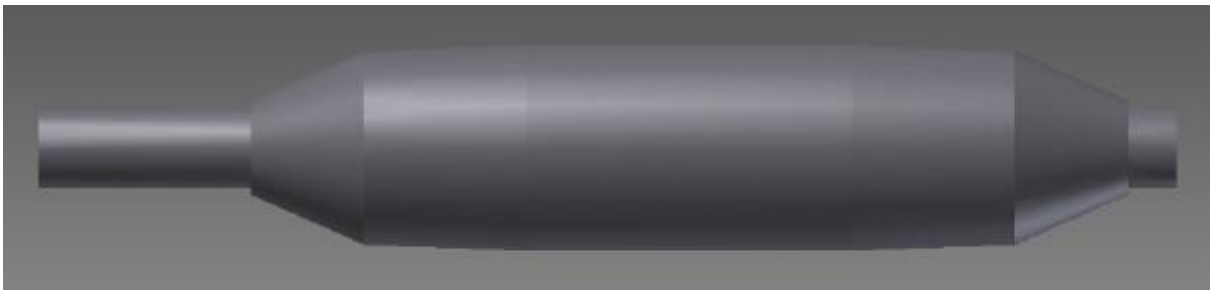


Figura 7. Rodillo delantero.



Figura 8. Rodillo trasero.

Por ejemplo, presentando cálculos a seguridad a fatiga:

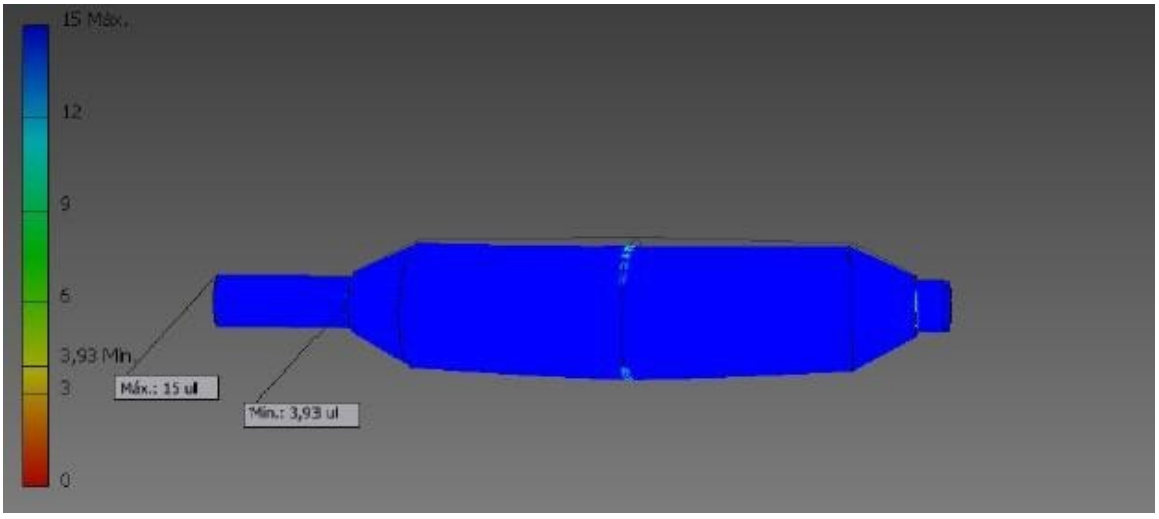


Figura 9. Resultado del coeficiente de seguridad en sección más crítica en rodillo delantero.

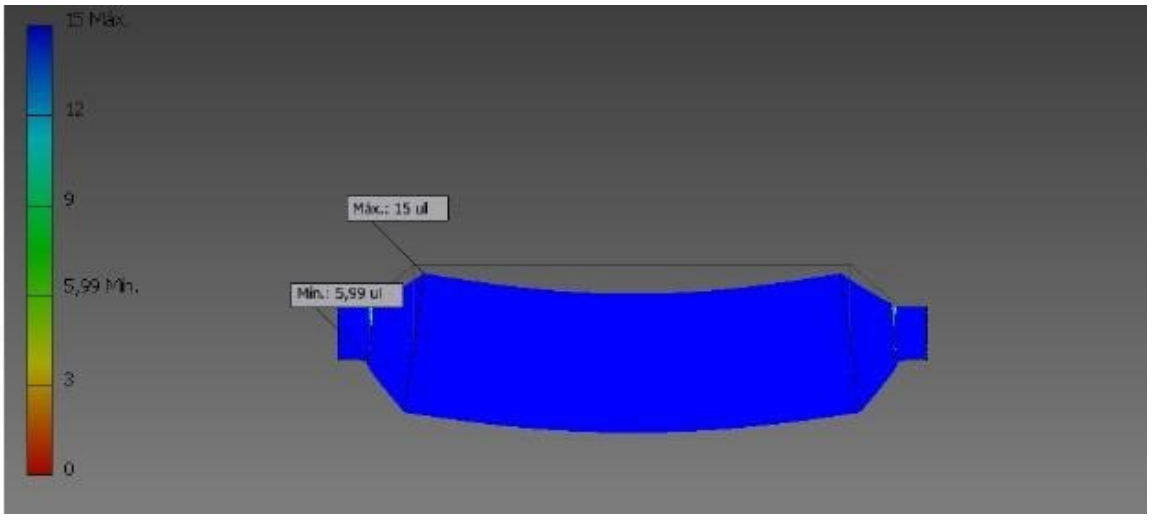
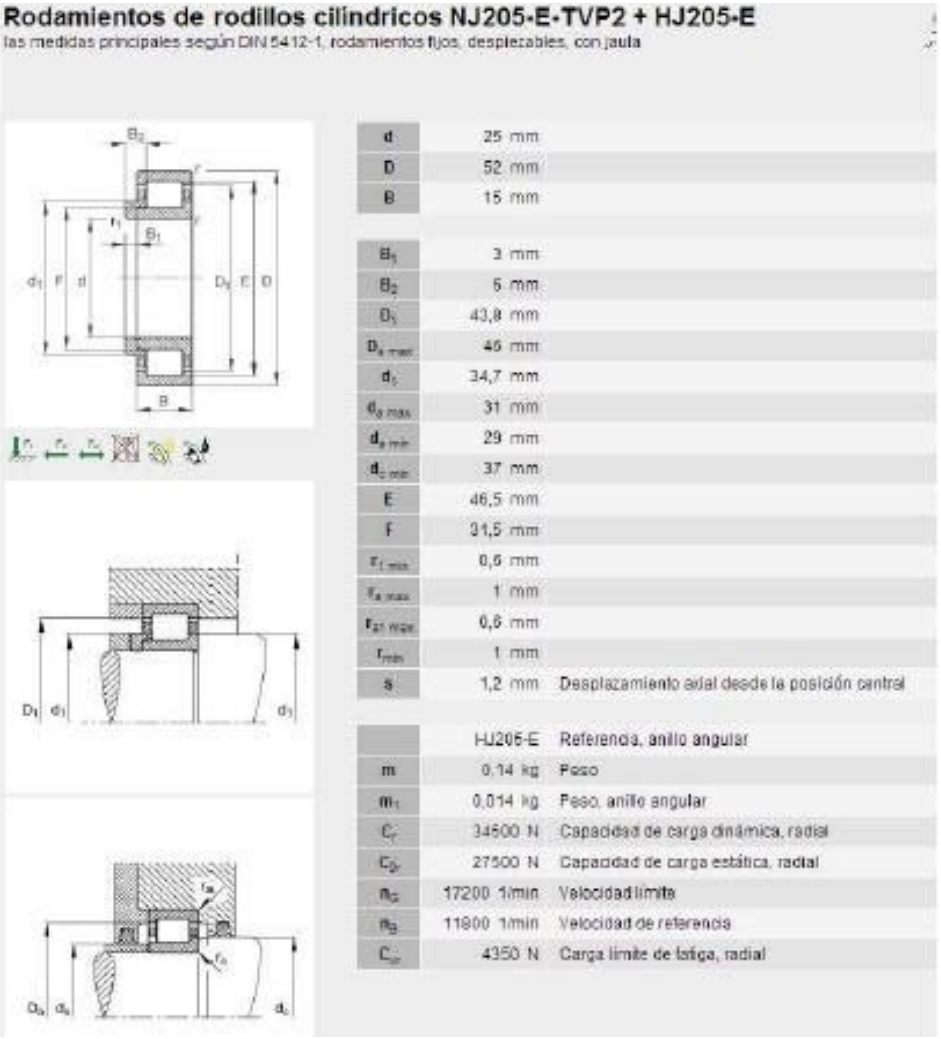


Figura 10. Resultado del coeficiente de seguridad en sección más crítica en rodillo trasero.

En ambos rodillos se está por encima del valor mínimo a coeficiente de seguridad en sección más crítica.

- **Cálculo de rodamientos**

1. El proceso para determinar el tipo de rodamiento será el siguiente:
   - ✔ Condiciones de trabajo del rodamiento.
   - ✔ Velocidad máxima de trabajo.
2. Esfuerzos soportados.
3. Cálculo de la carga dinámica equivalente (P).
4. Determinar la capacidad de carga (C).
5. Con el valor de C, seleccionar el rodamiento en un catálogo comercial.



Rodamientos de rodillos cilíndricos NJ205-E-TVP2 + HJ205-E

las medidas principales según DIN 5412-1, rodamientos fijos, desplazables, con jaula

d	25 mm	
D	52 mm	
B	15 mm	
B_1	3 mm	
B_2	6 mm	
D_1	43,8 mm	
$D_{a\ max}$	46 mm	
d_1	34,7 mm	
$d_{a\ max}$	31 mm	
$d_{a\ min}$	29 mm	
$d_{c\ min}$	37 mm	
E	46,5 mm	
F	31,5 mm	
$r_{1\ min}$	0,6 mm	
$r_{a\ max}$	1 mm	
$r_{2\ max}$	0,8 mm	
r_{min}	1 mm	
s	1,2 mm	Desplazamiento axial desde la posición central
	HJ205-E	Referencia, anillo angular
m	0,14 kg	Peso
m_1	0,014 kg	Peso, anillo angular
C_r	34500 N	Capacidad de carga dinámica, radial
C_{0r}	27500 N	Capacidad de carga estática, radial
n_G	17200 1/min	Velocidad límite
n_B	11900 1/min	Velocidad de referencia
C_{ur}	4350 N	Carga límite de fatiga, radial

Figura 11. Rodamiento seleccionado (Catálogo Rodamientos SKF (skf.com)).

El número de horas resultante para las condiciones de trabajo requeridas para el rodamiento seleccionado es de:

$$L_h = \frac{10^6}{60.10000}\left(\frac{34500}{6447}\right)^{\frac{10}{3}}$$

$$L_h = 447 \text{ horas}$$

- **Cálculo de la inercia del conjunto**

Considerando el siguiente sistema de referencia, y teniendo en cuenta que uno de los rodillos es más largo por la colocación en el exterior del conjunto del codificador de posición angular acoplado al mismo:

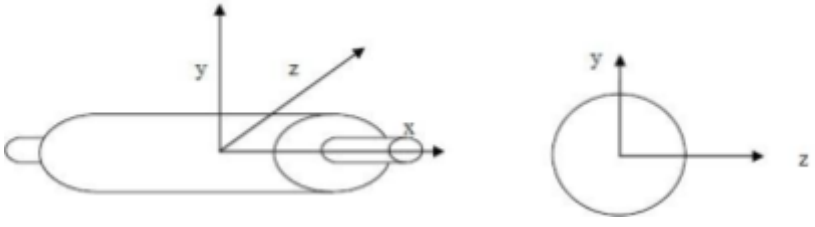


Figura 12. Esquema de cálculo de la inercia del conjunto.

Ix, conjunto = 0,3443 kgm^2; Iy, conjunto = 0,000294 kgm^2

Sumatorio que se encuentra por debajo del requerimiento máximo de cálculo a inercia máxima del conjunto.

- **Elección de tipo de Banda de Rodadura**

Se relacionan los requerimientos técnicos para la elección del tipo de banda de rodadura, no existiendo en el mercado banda para la funcionalidad específica del prototipo:

Soportar una importante carga puntual. En nuestro caso parte del peso total de ciclomotor y el conductor.

Soportar altas temperaturas, el rozamiento de la rueda tractora del ciclomotor con la banda podría alcanzar los 100ºC.

Rozamiento con la rueda tractora lo más alto posible para que exista la máxima adherencia entre ellas, asemejándose lo máximo posible a la realidad de la utilización del ciclomotor por vía pública.

Rozamiento con los rodillos lo más alto posible, ya que en el rodillo delantero se acopla el encoder de velocidad en un extremo del rodillo.

La banda elegida es la banda HABASIT HAG-12E, de características:

Tabla 1. Características de la banda HABASIT HAG-12E.

Grosor:	5,8 mm
Masa de la correoa (Peso de la correa):	4,6 kg/m^2
Radio de la barra de frente mínimo:	NA mm
Diámetro de la polea (mínimo):	80 mm
Diámetro mínimo de la polea contraflexión:	100 mm
Carga para 1% de extensión (K1% estático) por unidad de ancho (Norma Habasit SOP3-155/EN ISO21181):	19 N/mm
Fuerza de tracción para 1% de alargamiento después de relajación (K1% después de rodaje) por unidad de ancho (Norma Habasit SOP3-155:	13 N/mm
Fuerza de tracción admisible por unidad de ancho:	20 N/mm
Temperatura de funcionamiento admisible (continua):	Mín 0ºC Máx 100ºC
Coeficiente de fricción de la polea de accionamiento de acero:	0,15
Coeficiente de fricción de la polea de accionamiento con capa de fricción:	0,4
Coeficiente de fricción sobre la mesa de apoyo de acero decapapdado:	0,2
Coeficiente de fricción sobre la mesa de apoyo de acero inoxidable	0,15
Ancho de fabricación sin costuras	1200 mm

- **Cálculo de la estructura de soporte rectangular**

El material elegido para el cálculo es Hierro F-111. Material comercial barato, y con características mecánicas suficientes para la funcionalidad requerida.

Las dimensiones de la estructura serán, debido a requerimientos de componentes, y de funcionalidad por procedimiento de ensayo previsto, las siguientes:

Longitud: 475mm / Anchura: 300mm / Altura: 80mm

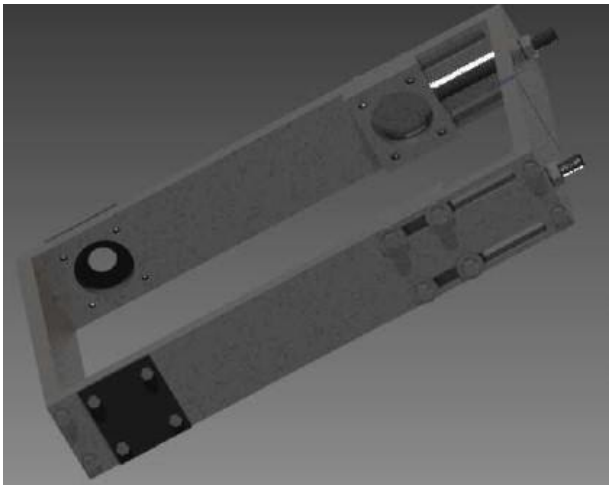


Figura 13. Perspectiva de estructura soporte.

Fase de construcción

Se presenta imagen definitiva del prototipo diseñado y calculado con los planos de construcción de elementos no normalizados con sus tolerancias de fabricación generados para iniciar la fase de construcción, y ensamblado con elementos normalizados por un taller de mecanizado industrial:

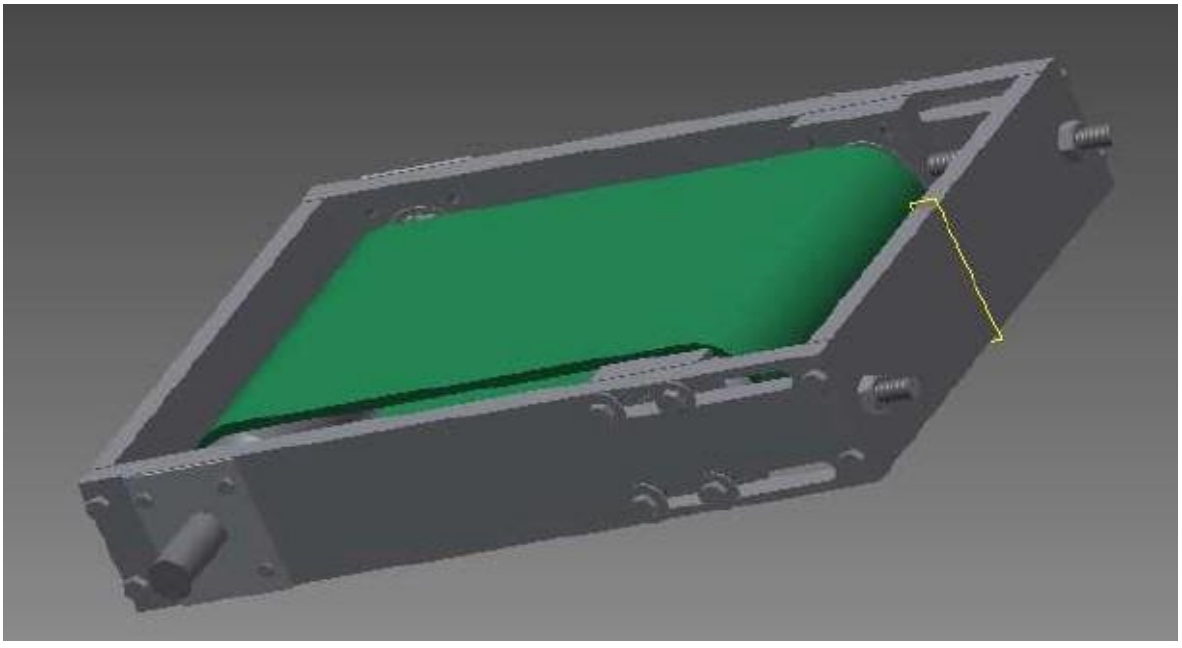


Figura 14. Perspectiva de prototipo para fase de construcción.

Los procesos de fabricación de las diferentes piezas no normalizadas del prototipo, tales como los rodillos, componentes de estructura de soporte y tensores, con sus respectivos materiales, serán:

Aserrado de piezas.

Torneado con control numérico (CNC).

Taladrado / Desbastado / Moleteado / Fresado.



Figura 15. Perspectiva de prototipo acabado de fase de fabricación.

Conclusiones

El prototipo de Velocímetro de Banda de Rodadura ha sido construido en base a todos los requerimientos técnicos del proyecto, así como con un presupuesto muy ajustado para a la disponibilidad económica.

En relación a la funcionalidad del nuevo velocímetro de banda de rodadura se ha de comentar que los ensayos realizados con éste, en comparación a los realizados con velocímetro de dos rodillos, y contra los realizados en funcionamiento en pista, condiciones normales de funcionamiento, han sido interesantes. Tanto que ha dado para el desarrollo de un proyecto final de carrera en la EUITI de la UMH.

Se “puede” comentar que, se vislumbra mejor comportamiento contra la realidad de funcionamiento, que en el velocímetro de dos rodillos.

Bibliografía

Calvo, J. A., Díaz, V., Olmeda, E., San Román, J. L., Gauchía, A. 2008. Procedure to verify the maximum speed of automatic transmission mopeds in periodic motor vehicle inspections. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering, 222(9), 1615-1623.

Chaplin, R. A., MacManus, D. G., Birch, T. J. 2010. Aerodynamic interference between high-speed slender bodies. Shock Waves, 20(2), 89-101.

Keall, M. D., & Newstead, S. 2013. An evaluation of costs and benefits of a vehicle periodic inspection scheme with six-monthly inspections compared to annual inspections. Accident Analysis & Prevention, 58, 81-87.

Manual Procedimiento de Estaciones ITV. Versión 7.3.1 (20/05/2018). Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Masi, M. 2010. Measurement of the effect on brake performance of the intake and exhaust system components in a motorbike high speed racing engine. Applied acoustics, 71(1), 1-10.

Ramos, J., del Río, P. S., Aracil, J., de Vergara, J. L. 2011. On the effect of concurrent applications in bandwidth measurement speedometers. Computer Networks, 55(6), 1435-1453.

Empleo de nariz, lengua y ojo electrónico de bajo coste para el monitoreo de procesos agroalimentarios.

A. Fernández López[1], M. Ferrández-Villena García[1], M. Oates[1], C. Molina Cabrera1, A. Conesa Celdrán[1], J. Ramos[2], N. Abu-Khalaf[3], A. Ruiz Canales[1]

[1] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO). – Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel Km 3.2. – 03312 Orihuela.E-mail: antonio.fernandez83@gmail.com

[2] College of Computing and Engineering, Nova Southeastern University Florida (USA), 3301 College Avenue, Fort Lauderdale, Florida 33314-7796. Jr1284@nova.edu

[3] Faculty of Agricultural Sciences and Technology, Palestine Technical University - Kadoorie (PTUK), Tulkarm. P.O.Box 7, Palestine. n.abukhalaf@ptuk.edu.ps

Resumen

Se expone la implementación de tres dispositivos de bajo coste, como son ojo, nariz y lengua electrónicas de bajo coste para el monitoreo de procesos agroalimentarios. La nariz electrónica es un dispositivo que consta de tres componentes principales, una muestra unidad de muestreo, una matriz de detección (sistema de detección de gases) y una unidad de procesamiento de datos (software de reconocimiento de patrones). Incluye también un sistema de entrega de muestras (cámara de muestras con bomba de aire o ventilador) y unidad de procesamiento de datos (microcontrolador Arduino Nano® con conexión USB). La lengua electrónica se basa en sensores generalmente integrados en una matriz, y su respuesta se analiza habitualmente mediante el reconocimiento de patrones según algoritmos. Se trabaja con lenguas electrónicas particularmente voltamperométricas, siendo versátiles, simples, robustas y muy sensibles a los cambios en los atributos redox de las muestras. El ojo electrónico o microfotofluorómetro, es una herramienta que admite una cantidad flexible de fuentes de luz y detectores para proporcionar información analítica que ayude en la identificación de líquidos. Estos dispositivos han encontrado un número de aplicaciones en la clasificación de complejos sistemas tales como muestras de agua y alimentos, de ahí que se planté su incorporación al sistema de gestión de insumos.

Palabras clave: sensores de bajo coste, compuestos orgánicos volátiles, solutos, fluorometría

Abstract

The implementation of three low-cost devices is exposed, such as low-cost electronic eye, nose and tongue for monitoring agri-food processes. The electronic nose is a device that consists of three main components, a sample sampling unit, a detection matrix (gas detection system) and a data processing unit (pattern recognition software). It also includes a sample delivery system (sample chamber with air pump or fan) and data processing unit (Arduino Nano® microcontroller with USB connection). Electronic language is based on sensors generally integrated in a matrix, and their response is usually analyzed by means of pattern recognition according to algorithms. Particularly voltammetric electronic languages are used, being versatile, simple, robust and very sensitive to changes in the redox attributes of the samples. The electronic eye, or microfotofluorometer, is a tool that supports a flexible number of light sources and detectors to provide analytical information to aid in the identification of liquids. These devices have found a number of applications in the classification of complex systems such as water and food samples, hence their incorporation into the input management system was considered.

Keywords: low cost sensors, volatile organic compounds, solutes, fluorometry.

Introducción

En ciertos procesos agroalimentarios es necesario el seguimiento y monitoreo de la calidad sensorial de los alimentos. La calidad sensorial de los alimentos se refiere a un conjunto de características como apariencia, color, sabor, olor, aroma, textura y propiedades auditivas. Cada uno de las anteriores características se pueden ver por separado, pero juntas representan un determinante importante de la calidad de los alimentos (Piggott, 1994; O'Riordan y Delahunty,2003; Biolatto *et al.*, 2007). El aroma es el más factor importante que influye en la intención de compra de los consumidores, estimación de la calidad y aceptación de los alimentos (Bakker, 1997; Santonico *et al.*, 2008). Se detecta una característica sensorial específica cuando es volátil.

Los compuestos entran en la porción del sistema nasal del olfato a través de la parte posterior de la garganta y llegar a ser detectado por los receptores olfativos (Gómez *et al.*, 2006). A pesar de la importancia del aroma como indicador de calidad alimentaria y aceptabilidad de un producto agroalimentario, estos productos se controlan tradicionalmente en la industria alimentaria por otra serie de parámetros. El control de los procesos de producción se ajusta a través de mediciones fisicoquímicas como el valor de pH y color, así como en virtud de la determinación espectroscópica de concentraciones de moléculas particulares. Ello se debe principalmente a la incapacidad práctica de evaluar instrumentalmente el aroma durante todo el proceso de producción (es decir, utilizando cromatografía). Con lo cual es necesario emplear paneles sensoriales.

Todos estos problemas prácticos fueron superados por la invención de Persaud y Dodd. En el año 1982 construyeron un dispositivo que imita al mamífero nariz, llamada "nariz electrónica" ("e-nose"). Un sistema similar, pero imitando el sentido del gusto, fue presentado por Toko y colaboradores (Hayashi *et al.*, 1990). De este modo se transformaba el concepto de información sobre la calidad del sabor (dulzor, amargor, acidez, salinidad o umami) en una señal eléctrica. Se establecieron así los términos "lengua electrónica" ("e-tongue") o "lengua electrónica" (Hayashi *et al.*, 1990; Toko, 1998; Tian *et al.*, 2007).

La principal ventaja de una nariz electrónica es que, una vez calibrado, puede evaluar continuamente el aroma durante todo el proceso de producción al mínimo coste (Ampuero y Bosset, 2003). Aparte de eso, Las técnicas instrumentales pueden llevar mucho tiempo y costes, requieren personal capacitado. Por lo tanto, el uso de una nariz electrónica y una lengua electrónica puede representar una buena opción para la medición indirecta de la calidad de los alimentos (Trihaas *et al.*, 2005). Sin embargo, una nariz electrónica, así como una lengua electrónica, no proporcionar información sobre la naturaleza de la constitución de los compuestos, pero sólo dan una huella digital del alimentos que se pueden investigar mediante análisis estadístico multivariante (Cosio *et al.*, 2006). Ésta es la razón de por qué el uso de nariz electrónica y lengua electrónica no puede convertirse en algo más que un método complementario al análisis sensorial (Hodgins, 1997; Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008). Si se combina con técnicas de reconocimiento de patrones, una nariz electrónica representa una herramienta rápida y eficiente para la clasificación de compuestos volátiles sin necesidad de procedimientos de separación (Cerrato Oliveros *et al.*, 2002). A diferencia de los métodos analíticos tradicionales, la técnica se basa en la comparación, en lugar de la separación (O'Riordan y Delahunty, 2003). Además de la industria alimentaria, la nariz electrónica y la lengua electrónica tiene aplicaciones en la industria del automóvil, la medicina, industria militar, tecnología espacial, tratamiento de aguas residuales, farmacia, agricultura y química.

En la industria láctea se definen los perfiles de aroma de la leche y de los productos lácteos por una mezcla compleja de volátiles a diferentes niveles que pueden verse afectados por la composición de la leche. Ello depende, entre otras cosas, del manejo del ganado lechero (genética, salud del rebaño y regímenes de alimentación) y proceso de fabricación de leche (Biolatto *et al.*, 2007). El tipo de leche

utilizada para el proceso de producción y maduración proceso son los principales factores que determinan los aromas característicos del queso (Cabezas *et al.*, 2007). Asimismo, la calidad industrial

y el éxito comercial de los productos lácteos pueden verse gravemente afectados por el deterioro microbiano de la leche. Esto puede conducir a la producción de indeseables sabores desagradables, defectos físicos y toxicidad por metabolitos (Magan *et al.*, 2001). Según las razones anteriores, nariz electrónica y lengua electrónica puede ser muy útiles en el análisis de volátiles y compuestos no volátiles de productos lácteos, con el fin de controlar su calidad.

Otro uso de las narices y lenguas electrónicas es en el análisis de la calidad del aceite de oliva (Oates *et al.*, 2018). En este caso emplea un dispositivo de nariz electrónica de bajo costo. El diseño esta nariz electrónica se puede mejorar suficientemente mediante el uso un software de gestión y análisis, para permitir clasificación de diferencias sutiles de olor. En particular, se usó para la clasificación de tipos de aceite de oliva. Se emplearon para este propósito varios sensores de gases de óxido de metal (MOQ). Los sensores se instalaron en una matriz de detección de un prototipo de nariz electrónica. Con este dispositivo, se tomaron varias muestras de varios aceites de oliva. Simultáneamente y con el fin de contrastar las metodologías, se realizó una prueba de análisis químico para las mismas muestras. Ese mismo dispositivo fue empleado por Oates *et al.* en 2020. En este caso se usó para detectar el bronceado de las palmeras en muestras vegetales. Para este propósito, diferentes hojas de palmera de Florida afectadas por esta enfermedad en varios estadíos de la misma. Las respuestas de frecuencia de los sensores MQ capturados fueron analizadas por método de análisis de componentes principales (PCA), encontrando un buen enfoque para la identificación de dicha enfermedad. Se probaron las etapas de progresión de los síntomas. Las respuestas de frecuencia de los sensores MQ capturados fueron analizados por el método de análisis de componentes principales (PCA) y se encontró una buena correlación.

En esta comunicación se describen los fundamentos de tres dispositivos de bajo coste (nariz, lengua y ojo electrónicos) que están desarrollando investigadores de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Inicialmente se muestran los fundamentos de estos dispositivos, así como algunos resultados de su aplicación. Esta tecnología es muy prometedora debido a su transversalidad y bajo coste de aplicación.

Material y Métodos

Nariz electrónica

Esta herramienta consta de tres componentes principales, una muestra unidad de muestreo, una matriz de detección (sistema de detección de gases) y una unidad de procesamiento de datos (software de reconocimiento de patrones). Incluye 8 sensores de gas MOQ diferentes (MQ-2, MQ-3, MQ-4, MQ-5, MQ-7, MQ-8, MQ-9 y MQ-135).

Éstos se fabrican para responder a una amplia gama de gases, por ejemplo, hidrógeno, monóxido de carbono, gases licuados del petróleo (GLP), amoniaco, entre otros. Al detectar estos gases específicos *per se*, cada uno de los sensores responde en diferentes formas de una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles (COV) que se combinan para producir una "firma de olor" única.

El sistema de la nariz electrónica incluye también un sistema de entrega de muestras (cámara de muestras con bomba de aire o ventilador) y unidad de procesamiento de datos (microcontrolador Arduino Nano ® con USB serial conexión). El software para el Nano se desarrolla en el procesamiento idioma usando Arduino IDE® versión 1.6.5. Se realiza el análisis de la transformada de Fourier (DFT) dentro de Microsoft Excel®. Las visualizaciones de datos bidimensionales se obtienen por Matlab.

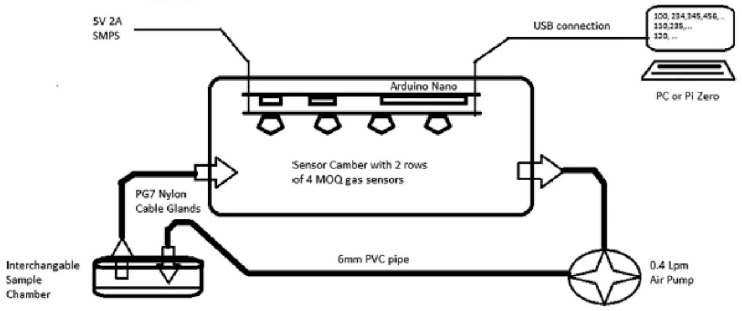


Fig. 1. Diagram of E-Nose system.

Figura 1. Esquema de nariz electrónica. Elaboración propia.

Lengua electrónica

Esta herramienta se basa en sensores generalmente integrados en una matriz, y su respuesta se analiza habitualmente mediante el reconocimiento de patrones según algoritmos. La idea de esta técnica es que, aunque la especificidad de cada sensor es baja, la combinación de varios sensores no específicos conlleva un potencial de información muy grande. Se trabaja con lenguas electrónicas particularmente voltamperométricas, siendo versátiles, simples, robustas y muy sensibles a los cambios en los atributos redox de las muestras. Las lenguas electrónicas han encontrado un número de aplicaciones en la clasificación de complejos sistemas tales como muestras de agua y alimentos, de ahí que se planté su incorporación al sistema de gestión de insumos.

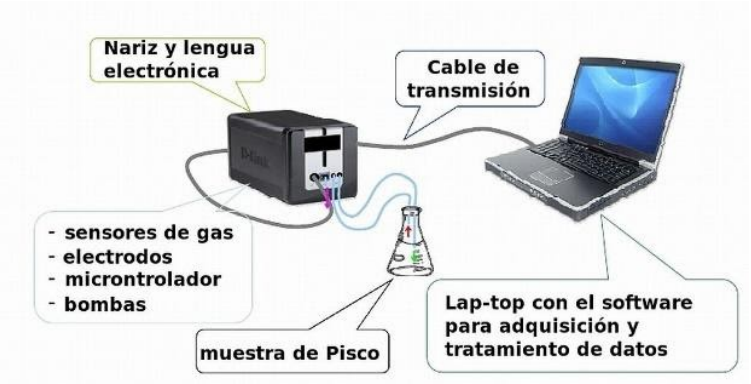


Figura 2. Esquema de lengua electrónica. Elaboración propia.

Ojo electrónico o Microfotofluorómetro.

Esta herramienta admite una cantidad flexible de fuentes de luz y detectores para proporcionar información analítica que ayude en la identificación de líquidos. El sistema puede construirse en varias configuraciones diferentes, sin embargo, se prepara un prototipo mediante un componente de bajo costo, 6 fuentes, 8 detectores, configuración de laboratorio utilizando muestras de 3 ml en tubos de ensayo de plástico o vidrio. Se puede monitorear la recirculación de agua dentro del sistema recirculante (NGS), entre otras variables. La secuenciación de próxima generación (NGS) es una tecnología de secuenciación masivamente paralela que ofrece un rendimiento, escalabilidad y velocidad ultra altos. La tecnología NDS se utiliza, entre otros fines, para determinar el orden de los nucleótidos en genomas completos o regiones específicas de ADN o ARN.

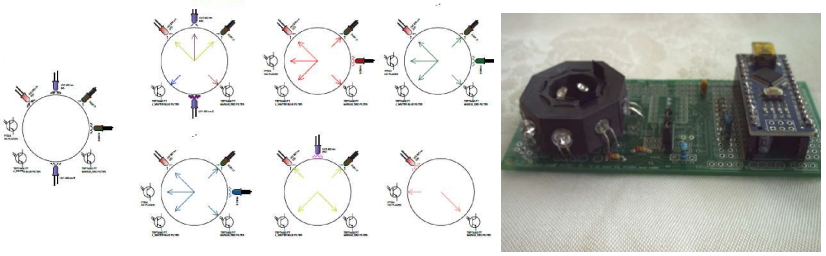


Figura 3. Microfotofluorómetro. Elaboración propia.

Resultados y discusión.

Se muestran algunos de los resultados obtenidos con la nariz electrónica del equipo de investigación, ya que con la lengua electrónica y el ojo electrónico no se han obtenido resultados concluyentes hasta la fecha.

Una primera muestra es la aplicación para la distinción de variedades de aceite de oliva. La figura 4 muestra la respuesta típica del sensor para los sensores MQ2 y MQ3 durante la primera hora y media después del encendido del sistema. Durante este tiempo, el sistema estuvo expuesto a muestras de aceite de oliva mezcla (*blended olive*, B-O), en la abcisa 11.919 (1310 segundos), aceite Picual virgen (V-P) en la abcisa 23,083 (2539 segundos), aceite de orujo (O-A) en la abcisa 34,356 (3779 segundos) y virgen extra-Aceite Picual (VX-P) en la abcisa 45,535 (5009 segundos). La respuesta del sensor MQ2 se puede ver que cambia tanto en el desplazamiento de CC como en la amplitud, ambos típicamente aumentando en una cantidad significativa en presencia de aceites de mayor calidad. Sin embargo, se ve que la respuesta MQ3 disminuye en amplitud y en forma. Sin embargo, la compensación de la corriente continua (CC) aumenta en todos los casos.

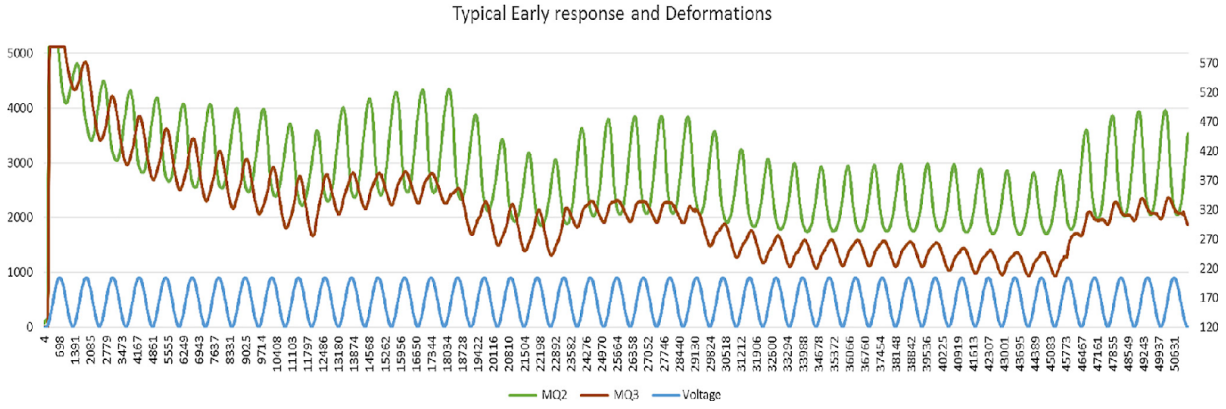


Figura 4. Formas de onda sinusoidales típicas de deformación en los sensores MQ2 y MQ3 para aceite de oliva.

Se muestran algunos resultados del análisis posterior a la toma de datos. Un ejemplo de separación de tipos de aceite usando el armónico cosenoidal, función MQ3 Cos3 (trazado en el eje X) frente a MQ135 Theta2 (trazado en el eje Y multiplicado por 1000) se puede ver en la figura 5 (valores de x = MQ3 Cos3, y = MQ135 Theta2 (* 1000)) que se encuentran arriba a la izquierda de una línea diagonal definida por y = (x − 4200) /2.26. Se trata predominantemente de aceites de oliva virgen extra, mientras que los que se encuentran abajo a la derecha de esta línea son de aceites vírgenes (el clasificador ya eliminó la mayoría de los otros tipos de aceite con las funciones MQ2 Abs1 previa y la función MQ5 Cos1.

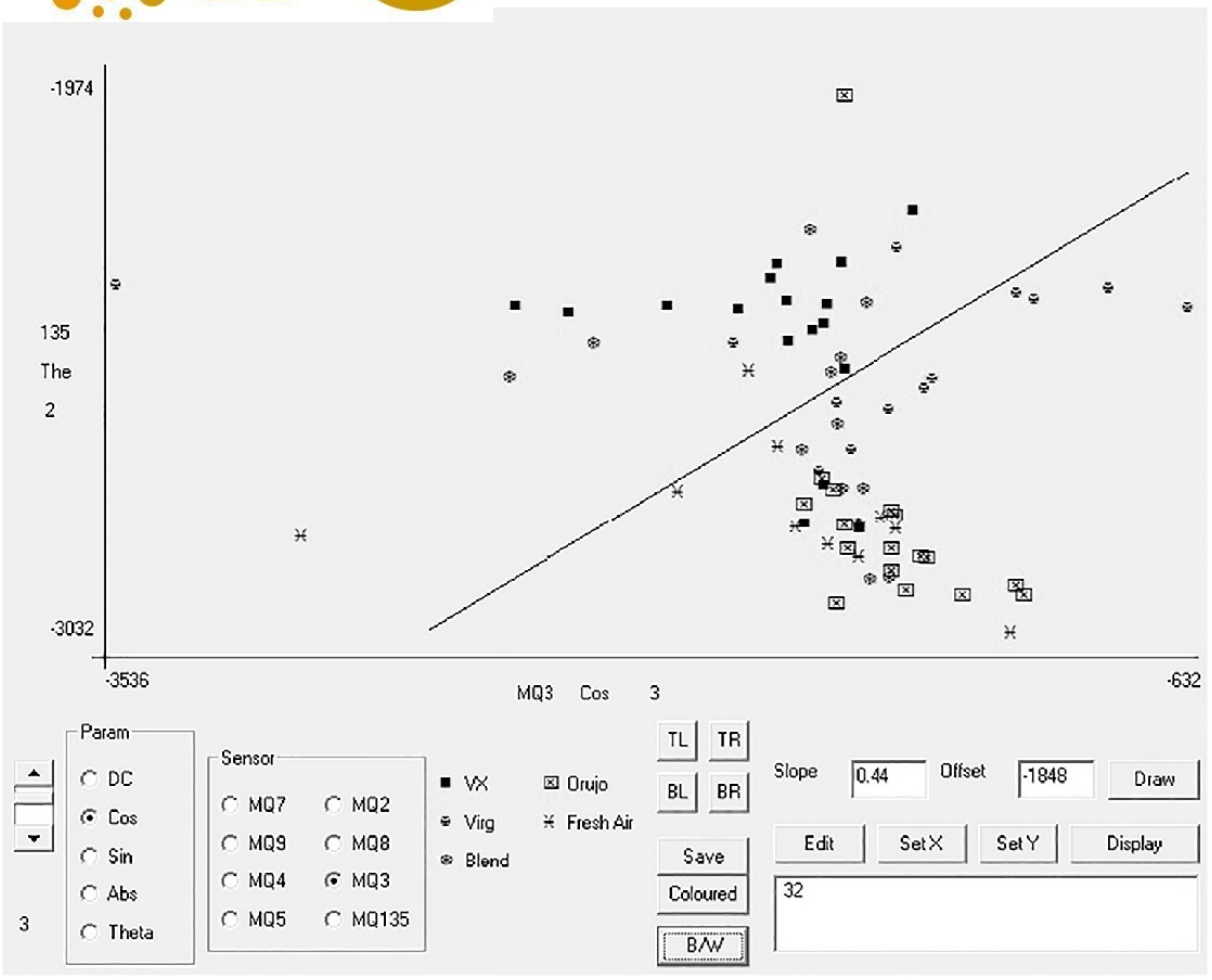


Figura 5. Separación de tipos de aceite utilizando las funciones MQ3 Cos3 y MQ135 Theta2.

El siguiente ejemplo muestra los análisis de datos de la medida mediante nariz electrónica para distinguir los diferentes estadíos de la enfermedad del bronceado de las palmeras en diferentes muestras de planta. Esta enfermedad se distingue por el olor.

En la figura 6 se muestra que la amplitud del primer armónico de coseno para la respuesta del sensor MQ5 (MQ5 Cos1) se representó frente a la amplitud del tercer armónico sinusoidal para el sensor MQ8 (MQ8 Sin3) para los datos de los tres experimentos. Esto indicó el agrupamiento del tipo de infección de respuesta y mostró una clara distinción entre las muestras infectadas y no infectadas. Las respuestas de las muestras no infectadas (HS) se representan en amarillo, desde la infección temprana (ES) en negro, de infección moderada (EM) en verde y de infección tardía (LS) en azul. El uso de otros los coeficientes se pueden utilizar para distinguir el aire fresco, entre otros.

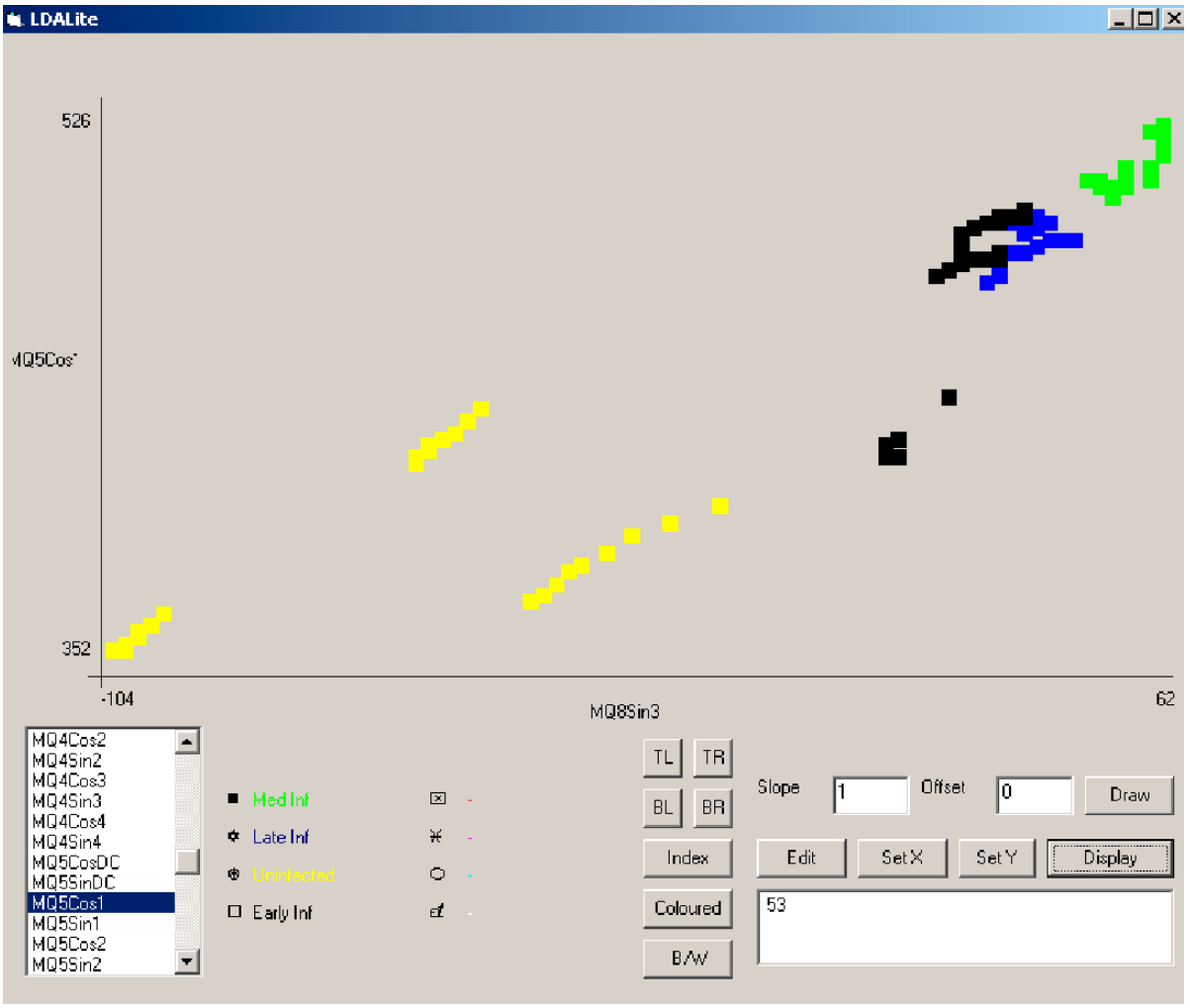


Figura 6. Separación del tipo de muestra utilizando MQ5 Cos1 y MQ8 Sin3 en los tres experimentos. Las respuestas de las muestras no infectadas (HS) se representan en amarillo, de la infección temprana (EE) en negro, de infección moderada (EM) en verde y de infección tardía (LS) en azul. El uso de otros coeficientes se puede utilizar para distinguir el aire fresco, etc.

Conclusiones.

Según estos resultados, estos prototipos testeados dan un alto grado de predicción precisa (en la región del 90%) cuando se le pide que distinga entre el variedades de aceites y estadíos del bronceado de las palmeras.

Igualmente, algunos sensores arrojaron una tasa de éxito del 93,75% con una probabilidad contra probabilidad aleatoria de menos de 0,00026.

El uso de diferencias de potencial de calentamiento sinusoidal mejora claramente la sensibilidad de algunos sensores MOQ disponibles comercialmente y su respuesta.

La selectividad mejorada se ve claramente en las formas de onda de respuesta MQ3, mientras que el análisis de la transformada de Fourier (DFT) muestra que hay contenido de información relevante para la clasificación de la variedad de aceituna en aceite de oliva y del estadío del bronceado de las palmeras (palmeras infectadas y sanas).

A pesar de los bajos costos de los componentes y la simplicidad general de estos dispositivos, el uso de técnicas de software más sofisticadas como la obtención de la función sinusoidal, los programas de

excitación del sensor y los métodos de análisis de datos DFT, parecen para lograr algunos resultados dignos de mención. Si bien no entrega ningún tipo de análisis de composición química reconocida, por patrón efectivo.

El dispositivo se puede entrenar para reconocer una gama de "firmas de olores". Dado su bajo costo, el dispositivo claramente tiene un potencial significativo en muchos otros campos de estudio.

Se planean más experimentos en los que la temperatura y la humedad del aire, y la temperatura de la muestra se registrará para ver si la compensación de este parámetro puede reducir la variabilidad de la respuesta de la muestra.

La solución de uso de sensores de bajo costo es abierta y permite la conexión a otros dispositivos con productos estandarizados en el mercado.

El software de análisis de datos empleado podría mejorarse para incluir un servidor de datos que responda a las solicitudes específicas, según la sustancia que se analice desde una plataforma de nube de datos u otros dispositivos como teléfonos móviles, tabletas, etc.

Los datos almacenados (históricos y en tiempo real) se pueden depositar en cuadros de mando accesibles a través de la web en cualquier navegador y son muy intuitivos de interpretar.

Estos dispositivos son una solución adecuada para la detección rápida de variedades de aceite y enfermedades de plantas después de un período de "entrenamiento" del dispositivo.

Bibliografía

Ampuero, S., Bosset, J.O., 2003. The electronic nose applied to dairy products: a review. Sensors and Actuators B 94, 1-12. doi: dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00321-6.

Bakker, J. (1997) Sensory evaluation of dairy flavours. Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk, 2. izd. (Law, B.A., ed.), Blackie Academic and Professional, London, 341-362. doi: dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-1121-8_11.

Biolatto, A., Grigioni, G., Irurueta, M., Sancho, A.M., Taverna, M., Pensel, N., 2007. Seasonal variation in the odour characteristics of whole milk powder. Food Chemistry 103, 960-967. doi: dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.050.

Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Sesena, S., Palop, M.L.L., 2007. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. Food Control 18, 11-17. doi: dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.07.010.

Cerrato Oliveros, M.C., Perez Pavon, J.L., Garca Pinto, C., Fernandez Laespada, M.E., Moreno Cordero, B., Forina, M., 2002. Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils. Analytica Chimica Acta 459, 219-228. doi: dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00119-8.

Cosio, M.S., Ballabio, D., Benedetti, S., Gigliotti, C., 2006. Geographical origin and authentication of extra virgin olive oils by an electronic nose in combination with artificial neural networks. Analytica Chimica Acta 567, 202-210. doi: dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.035.

Gomez, A.H., Wang, J., Hu, G., Pereira, A.G., 2006. Electronic nose technique potential monitoring mandarin maturity. Sensors and Actuators B 113, 347-353. doi: dx.doi.org/10.1016/j.snb.2005.03.090.

Gutiérrez-Méndez, N., Vallejo-Cordoba, B., González- Córdova, A.F., Nevárez-Moorillón, G. V., Rivera-Chavira, B., 2008. Evaluation of Aroma Generation of Lactococcus lactis with an Electronic Nose and Sensory Analysis. Journal of Dairy Science 91, 49-57. doi: dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0193

Hayashi, K., Yamanaka, M., Toko, K., Yamafuji, K., 1990. Multichannel taste sensor using lipid membranes. Sensors and Actuators B: Chemical 2 (3), 205-213. doi: dx.doi.org/10.1016/0925-4005(90)85006-K.

Hodgins, D., 1997. The electronic nose: Sensor arraybased instruments that emulate the human nose. In: Techniques for Analysing Food Aroma (R. Marsili, ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 331-371.

Magan, N., Pavlou, A., Chrysanthakis, I., 2001. Milksense: avolatile sensing system recognise spoilage bacteria

and yeasts in milk. Sensors and Actuators B, 28-34. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00621-3.

Oates, M. J., Fox, P., Sanchez-Rodriguez, L., Carbonell-Barrachina, A.A., Ruiz-Canales, A., 2018. DFT based classification of olive oil type using a sinusoidally heated, low cost electronic nose. Comput. Electron. Agric. 155: 348-358 (2018). https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.10.026.

Oates, M.J., Abu-Khalaf, N., Molina-Cabrera, C., Ruiz-Canales, A., Ramos, J., Bahder, B.W. 2020. Detection of Lethal Bronzing Disease in Cabbage Palms (Sabal palmetto) Using a Low-Cost Electronic Nose. Biosensors (Basel), 10(11), 188. https://doi.org/10.3390/bios10110188.

O'Riordan, J.P., Delahunty, C.M. 2003. Characterisation of commercial Cheddar cheese flavour. 1: traditional and electronic nose approach to quality assesment and market classification. International Dairy Journal 13, 355-370. doi: dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00005-0.

Piggot, J.R., 1994. Understanding flavour quality: diffcult or impossible? Food Quality and Preference 5 (1-2), 167-171. doi: dx.doi.org/10.1016/0950-3293(94)90024-8.

Santonico, M., Pittia, P., Pennazza, G., Martinelli, E., Bernabei, M., Paolesse, R., D'Amico, A., Compagnone, D., DiNatale, C. (2008): Study of the aroma of artificially flavoured custards by chemical sensor array fingerprinting. Sensors and Actuators B 133, 345-351. doi: dx.doi.org/10.1016/j.snb.2008.02.053.

Tian, S.-Y., Deng, S.-P., Chen,Z.-X., 2007. Multifrequency large amplitude pulse voltammetry: A novel electrochemical method for electronic tongue. Sensors and Actuators B 123, 1049-1056. doi: dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.11.011.

Toko, K., 1998. Electronic tongue, Biosensors and Bioelectronics 13, 701-709. doi: dx.doi.org/10.1016/S0956-5663(98)00025-6.

Trihaas, J., Vognsen, L., Nielsen, P.V., 2005. Electronic nose: New tool in modelling the ripening of Danish blue cheese. International Dairy Journal 15, 679-691. doi: dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.023.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Empleo de nariz electrónica de bajo coste en el monitoreo de colmenas de abejas.

E. González María [1], A. Madueño Luna [2], A. Ruiz Canales [1]

[1] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO). – Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel Km 3.2. – 03312 Orihuela. E-mail: eduardo.raspeig@gmail.com

[2] Departamento/Unidad: Ingeniería Aeroespacial y Mecánica de Fluidos, Universidad de Sevilla, Camino de los Descubrimientos, s/n. 41092 Sevilla. E-mail: amaduenoluna@gmail.com

Resumen

La polinización realizada por las abejas es muy importante para la subsistencia de muchos cultivos y el equilibrio del ecosistema. En los últimos años, las poblaciones de abejas melíferas están disminuyendo de forma considerable, debidas fundamentalmente a la aplicación de fitosanitarios en agricultura como el efecto del cambio climático. El monitoreo remoto de la colmena es fundamental para conseguir la mayor información posible. No obstante, la monitorización de procesos biológicos es un problema más complejo dado que cualquier cuerpo extraño en el interior de la colmena se convierte en un objetivo que las abejas neutralizan mediante la aplicación de propóleos. Ello podría alterar en este caso las mediciones realizadas por los sensores. Debido a la importancia de mantener las condiciones de trabajo de las abejas interiores de la colmena y la obtención de datos más confiables, se pretende instalar una red de sensores variados. Entre ellos, una nariz electrónica de bajo coste para el monitoreo de compuestos orgánicos volátiles en el interior de la colmena. Se incluye un sistema de monitoreo remoto y autónomo formado por un nodo inalámbrico. El sistema para el monitoreo de variables físicas dentro y fuera de una colmena es completamente escalable, en cuanto a sensores y colmenas. Se logra monitorear diferentes puntos dentro y fuera de ella, y permitiendo almacenar los datos recopilados. Se ha elaborado un sistema electrónico basado en Arduino®, especialmente diseñado para adaptarse a las condiciones internas y externas de la colmena. Este sistema se basa en la medición de diferentes parámetros internos y externos mediante sensores electrónicos disponibles en el mercado y compatibles con Arduino®, alimentados por un panel solar y conectados a la red mediante un nodo inalámbrico.

Palabras clave: compuestos orgánicos volátiles, redes inalámbricas, apicultura

Abstract

The pollination carried out by bees is very important for the subsistence of many crops and the balance of the ecosystem. In recent years, honey bee populations have been declining considerably, mainly due to the application of phytosanitary products in agriculture such as the effect of climate change. Remote monitoring of the hive is essential to get as much information as possible. However, the monitoring of biological processes is a more complex problem since any foreign body inside the hive becomes a target that the bees neutralize through the application of propolis. This could alter the measurements made by the sensors in this case. Due to the importance of maintaining the working conditions of the bees inside the hive and obtaining more reliable data, it is intended to install a network of varied sensors. Among them, a low-cost electronic nose for monitoring volatile organic compounds inside the hive. A remote and autonomous monitoring system consisting of a wireless node is included. The system for monitoring physical variables inside and outside a hive is completely scalable, in terms of sensors and hives. It is possible to monitor different points inside and outside of it, and allowing the collected data to be stored. An electronic system based on Arduino® has been developed, specially designed to adapt to the internal and external conditions of the hive. This system is based on the measurement of different internal and external parameters using electronic sensors available on the market and compatible with Arduino®, powered by a solar panel and connected to the network through a wireless node.

Keywords: volatile organic compounds, wireless networks, beekeeping.

Introducción

En los últimos años el sector apícola viene manteniendo un crecimiento constante, tanto en número de colmenas, como de explotaciones y de apicultores. En el ámbito comunitario, España destaca por su censo de colmenas (alrededor del 16% de las colmenas en la UE), así como por el hecho de que el 80% se encuentra en manos de apicultores profesionales (aquéllos que gestionan más de 150 colmenas) (MAPA, 2020). Sin embargo, en los últimos años la tasa de disminución de la población de abejas ha aumentado significativamente, provocando graves pérdidas económicas a los apicultores.

El aumento de la mortalidad de las abejas es atribuible a múltiples factores de estrés, que varían en función de la zona geográfica, las características locales o las condiciones climáticas. Los principales factores de estrés se han identificado, pero los mecanismos que desencadenan la pérdida de colonias siguen sin estar claros (Goulson *et al.*, 2015). Esto se debe a que muchos de estos factores ambientales no matan a las abejas, sino que tienen efectos sinérgicos menos letales que perjudican el comportamiento de los individuos provocando el colapso de la colmena (Klein *et al.*, 2017).

Por otro lado, el manejo de la explotación apícola requiere, entre otras actividades, numerosas inspecciones visuales durante el año, imprescindibles para evaluar la salud de la colmena y determinar cuándo y qué tipo de acciones adicionales son necesarias. Entre estas acciones se incluyen la incorporación de "alzas" y “cuadros”, ya sea para dividir una colmena, ampliarla o combinarla con otra colmena. También se encuentran la alimentación auxiliar o el tratamiento contra alguna enfermedad (Fels *et al.*, 2019).

La monitorización de los parámetros que afectan a la salud de la colmena, con un acceso remoto, permite al apicultor tomar decisiones de forma anticipada sobre el manejo sin necesidad de acudir al colmenar, y es una herramienta que contribuye a la optimización de la explotación y la disminución de la mortandad de las abejas.

En el caso de la abeja de la miel (*Apis Mellifera,* L.), se han desarrollado numerosos estudios de monitorización con dispositivos electrónicos a lo largo de las últimas décadas.

Los sensores más utilizados han sido temperatura y humedad (Szabo, 1980; Gil-Lebrero *et al.*, 2017; Murphy *et al.*, 2015a; Kridi *et al*., 2016). Numerosos estudios han establecido una relación directa de la relación entre la humedad y la temperatura interior de la colmena con el efecto de la enjambrazón, cuya consecuencia es negativa para la producción de miel y polen, dado que debilita las colonias y la recuperación de los enjambres supone mucho trabajo.

También se han realizado numerosos estudios con sensores de peso (Rector *et al.*, 2008; Zacepins *et al.*, 2017) e interpretación de imagen (Chen *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2017; Murphy *et al.*, 2015c) utilizados fundamentalmente para evaluar el comportamiento de las abejas fuera de la colmena y sus hábitos alimenticios

El monitoreo del peso de la colmena permite evaluar la eficiencia de la nutrición de la colmena y cuantificar el consumo de alimentos durante los períodos de hibernación o mala climatología en los que las abejas pecoreadoras no pueden salir a recolectar néctar y polen. Por otro lado, el conteo de abejas mediante la evaluación de las imágenes permite calcular cuánto tiempo pasan los individuos fuera de la colmena.

Otras investigaciones como las realizadas por Bencsik *et al.*, 2011 o Pérez *et al.*, 2016, también han evaluado la vibración y sonido en el interior de la colmena. El objetivo de estos estudios consistió en monitorear a tiempo real un conjunto de señales de vibración que fuera capaz de identificar el momento de la enjambrazón. Por otra parte, la percepción de cambios irregulares en el espectro de amplitud de las señales de sonido a lo largo del tiempo puede usarse como un indicador de salud de la comunidad de abejas.

En investigaciones recientes como las realizadas por Murphy *et al*., 2015b, se estudió cómo puede afectar el nivel de dióxido de carbono, la concentración de oxígeno y los gases contaminantes en el interior de la colmena.

Como se ha visto anteriormente, las redes de sensores inalámbricos WSN (*Wireless Sensor Networks*) son una herramienta muy útil para estudiar el comportamiento de las abejas y poder anticiparse a posibles acontecimientos sin perturbar la vida de la colmena y sin necesidad de acudir al colmenar, contribuyendo, por tanto, a una optimización de la productividad. Debido a los componentes de pequeño tamaño, esta tecnología es escalable y rentable, y puede conducir a un agronegocio optimizado, eficiente y respetuoso con el medio ambiente.

No obstante, hay que destacar que la instalación de sensores en el interior de una colmena supone un reto más complejo que la monitorización de un proceso industrial. Es importante tener en cuenta la adaptación de los sensores así como su situación en el interior de la colmena, ya que cualquier objeto extraño se convierte en un objetivo que las abejas neutralizan de forma inmediata mediante la aplicación de propóleos, y podrían alterar o modificar negativamente las mediciones del sensor (Gil Lebrero, *et al.*, 2016).

El objetivo de este trabajo es describir un sistema remoto de monitoreo de bajo coste y bajo consumo que permita la recopilación de parámetros internos de la colmena, así como de las variables climáticas externas que favorezcan la optimización en el manejo del colmenar. El dispositivo objeto de este estudio incorpora sensores de humedad y temperatura, peso y una nariz electrónica. Además, tiene la capacidad de incorporar otros sensores adicionales como sensores de imagen y vibración.

En este documento se describe el desarrollo del sistema de monitorización. Los resultados de las mediciones realizadas no son objeto de esta comunicación.

Material y Métodos

El estudio se va a realizar con abeja española o abeja ibérica (*Apis mellifera ibérica*) en un asentamiento emplazado en la región de Navacerrada, en la Comunidad de Madrid.

Para lograr el objetivo propuesto se realizó una investigación documental con la revisión en las bases de datos científicas y la literatura apropiada por su carácter científico y actualizado. Se identificaron los sensores utilizados en investigaciones anteriores que permitieron la organización y elaboración de un listado material.

Se llevó a cabo una revisión de la literatura sobre la monitorización y sensorización de colmenas en bases de datos bibliográficas y artículos en redes sociales científicas mediante las palabras clave necesarias.

Una vez revisada toda la documentación, se establece el diagrama de flujo con el material escogido (Figura 1).

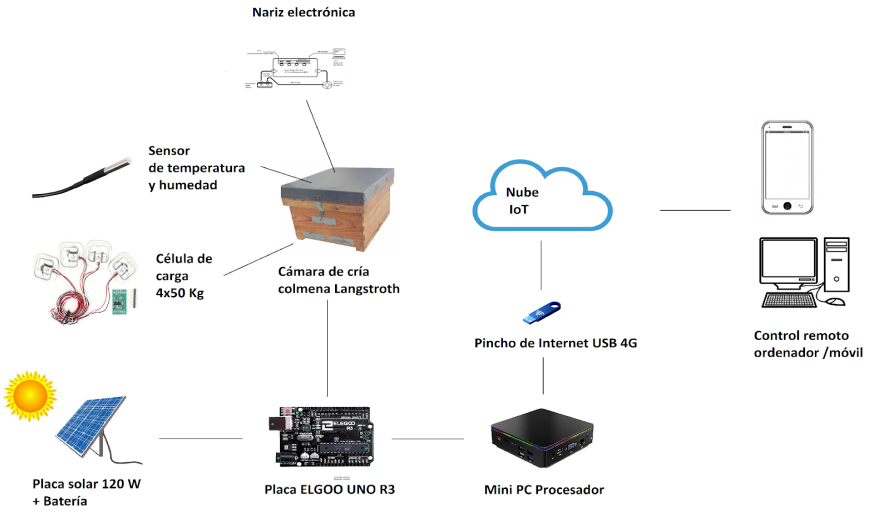


Figura 1. Esquema sistema de monitorización propuesto. Elaboración propia.

En la siguiente tabla se detalla el coste unitario de los materiales adquiridos y unidades necesarias, según la ilustración 1, para diseñar el sistema de monitorización remota de la colmena. El coste del sistema oscilaría los 593 euros. Dado que el envío de datos en remoto se va a realizar a través de un pincho USB 4G, quedaría pendiente por incluir el coste según contrato con la compañía telefónica.

Tabla 1. Coste de los materiales adquiridos.

Materiales	Unidades	Importe unitario	Importe Total
Colmena Langstroth Cámara de cría + Alza	1	59,95 €	59,95 €
Mini PC Windows 10 Intel Z8350 Procesador	1	180,00 €	180,00 €
Placa ELEGOO UNO R3	2	10,00 €	20,00 €
Sensor de temperatura y humedad modelo FS200-SHT20	3	6,89 €	20,67 €
Sensor de peso 4 células de carga 50 kg con módulo AD HX711	1	12,00 €	12,00 €
Panel Solar PlusEnergy 150W 12V Policristalino	1	85,00 €	85,00 €
Batería	1	35,58 €	35,58 €
Cableado conexiones y accesorios (HUB multipuerto)	1	30,00 €	30,00 €
Nariz electrónica bajo coste 8 sensores MQ	1	150,00 €	150,00 €
Importe materiales			**593,20 €**

Para albergar a la colonia de abejas se ha escogido la colmena de alzas modelo *Langstroth*. Se trata de una colmena de crecimiento vertical, adecuada para procesos de producción complejos y especializados, como por ejemplo la cría de reinas o la producción de jalea real. Permite el intercambio de cuadros entre la cámara de cría y las alzas lo que facilita el manejo de la colmena. Es recomendable en zonas frías por su buen comportamiento durante la invernada, dado que al tener un tamaño más pequeño permite tener un bolo más recogido que otros modelos. La colmena *Langstroth* está actualmente muy extendida en la zona norte de España y en Europa. El precio de la colmena completa (cámara de cría + alza) oscila los 59,59 euros.

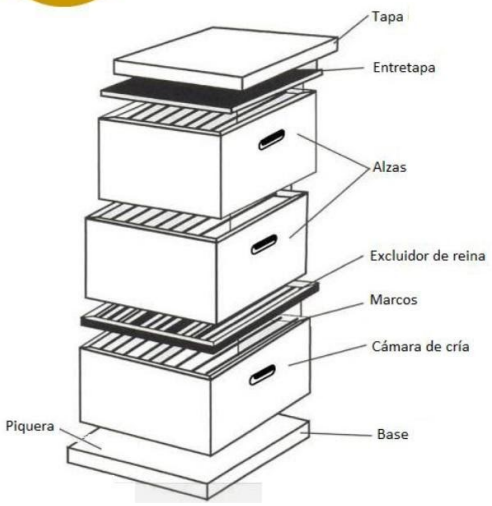


Figura 2. Esquema colmena tipo Langstroth. Fuente Jordi Besora Magem. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Perú.

Para la alimentación del sistema se ha elegido un panel Solar de 150W policristalino para sistemas de 12V. El voltaje a potencia nominal es de 17,84 V, y un voltaje de circuito abierto de 22,14V. Suministra una intensidad de corriente a potencia máxima de 8,41 amperios. Dispone de celdas solares *Polykritallin* y un vidrio templado de seguridad de 3,2 mm para protegerlo contra las influencias ambientales como el granizo, la nieve y el hielo. El rango de temperatura oscila de -40º a +85 ºC, con una tolerancia de +/-3%.

Para la implementación de la unidad de almacenamiento y envío de datos, se ha elegido el Mini PC Windows 10 Intel. Este dispositivo cuenta con un procesador Intel Z8350 de cuatro núcleos, hasta 1,68 GHz, y 4 GB de RAM y 64 GB de ROM. El ordenador cuenta con sistema WiFi 2.4G / 5.0G integrado que permite la comunicación con sensores inalámbricos. Permite ampliar la memoria con una tarjeta Micro SD de hasta 128 GB lo que permite el almacenamiento de datos off-line sin necesidad de un adaptador externo. El precio del dispositivo se encuentra en torno a los 180 euros.



Figura 3. Mini PC Windows 10 Intel Z8350 Procesador.

Para programar la frecuencia en la toma de datos de los sensores se utilizará una placa ELEGOO UNO R3 compatible con Arduino IDE. Utiliza el microcontrolador ATmega328-P. Cuenta con 14 pines de E/S digitales y 6 entradas analógicas, también tiene 1 UART (puerto serie por hardware)), un oscilador de cristal de 16 MHz, con una conexión USB, un conector ICSP y un botón de reinicio. Su precio oscila los 6 euros.

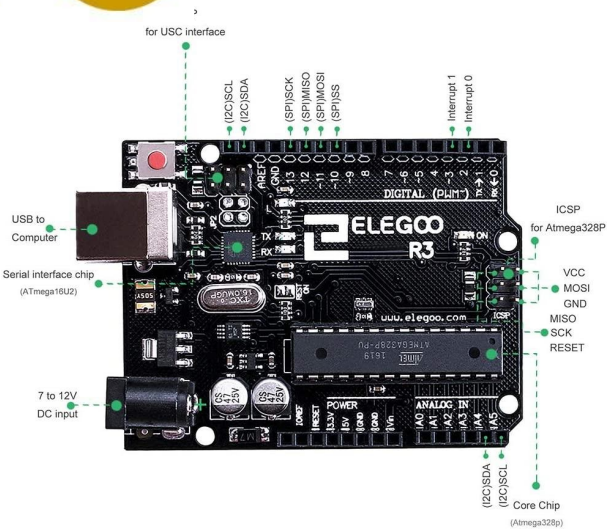


Figura 4. ELEGOO UNO R3.

Para la medición de temperatura y humedad se han elegido tres sensores modelo FS200-SHT20 que se instalarán en diferentes puntos del interior de la colmena: uno en los cuadros centrales de la cámara de cría, otro en los cuadros de miel y polen y el tercero en la parte alta de la colmena.

Se trata de un sensor digital, con una resolución de hasta 14 bits que trabaja con un voltaje de funcionamiento: 3,3-5 V. La corriente de trabajo es inferior a 15mA. Tiene un rango de medición: temperatura que oscila desde los - 20 °C hasta los 100 °C, y un rango de humedad relativa de 0 hasta 100% RH, con una precisión de humedad del 3%. El precio de este sensor oscila entre 6,89 euros y 29,69 euros.



Figura 5. Sensor de temperatura y humedad modelo FS200-SHT20.

Para la monitorización del peso de la colmena se ha elegido el módulo de sensor de peso con módulo AD HX711 y cuatro células de carga de 50kg. Este módulo utiliza un convertidor A / D 24 de alta precisión con chip hx711, y está diseñado para la escala electrónica de alta precisión. Dispone de dos canales de entrada analógica, y un amplificador de ganancia programable integrado con un multiplicador de 128x. El rango de voltaje de entrada en funcionamiento oscila de 4,8 hasta 5,5V. El precio del sensor de peso con las cuatro células de carga y el módulo AD HX711 oscila los 12 euros.

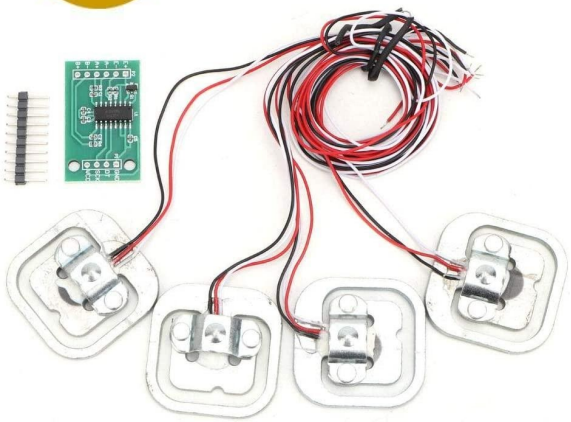


Figura 6. Sensor de peso 4 células de carga 50 kg con módulo AD HX711.

Para la monitorización de gases interiores de la colmena, se pretende utilizar un dispositivo compuesto por una matriz de ocho sensores MQ (MQ2, MQ3, MQ4, MQ5, MQ7, MQ8, MQ9 y MQ135) con un Arduino NANO® como datos equipo de adquisición de datos. Se trata de sensores comerciales de bajo coste. Cada sensor está diseñado para detectar un tipo de gas; MQ2 = LPG, hidrógeno y propano, MQ3 = alcohol, MQ4 = metano, MQ5= hidrógeno y LPG MQ7 = hidrógeno y monóxido de carbono, MQ= hidrógeno, MQ9 = monóxido de carbono y gases licuados del petróleo (GLP), y MQ135 = amoníaco, alcohol y benceno, entre otros.

La nariz electrónica se instalará en la entretapa de la colmena. La entretapa es una cubierta que va colocada encima de la última alza y sirve para mantener una cámara de aire aislante y como elemento separador para el manejo. Consta de una tabla de madera (puede ser de plástico) enmarcada.

El tubo de aspiración del aire que permitirá la toma de datos se conectará en el orificio de la entretapa que da acceso a la cámara de cría. El tubo de conexión es de PVC de 6 mm de diámetro exterior (4 mm de diámetro interno) que conecta en el otro extremo a la cámara de sensores de 700 ml de PP5 (PVC de calidad alimentaria) y que contiene la matriz de sensores MQ. El dispositivo cuenta con una bomba de aire de 0,4 Lpm que recircula el aire en el interior de la cámara de muestra.

Todos los sensores deben ser sometidos a un quemado de alrededor de 48h para eliminar cualquier resto de humedad. Después del quemado, las resistencias “trimpot” utilizadas para cada sensor deben ajustarse para obtener una respuesta de línea base de 2 voltios. El quemado de 48h debe repetirse si el dispositivo se deja sin usar durante un periodo superior a tres meses.

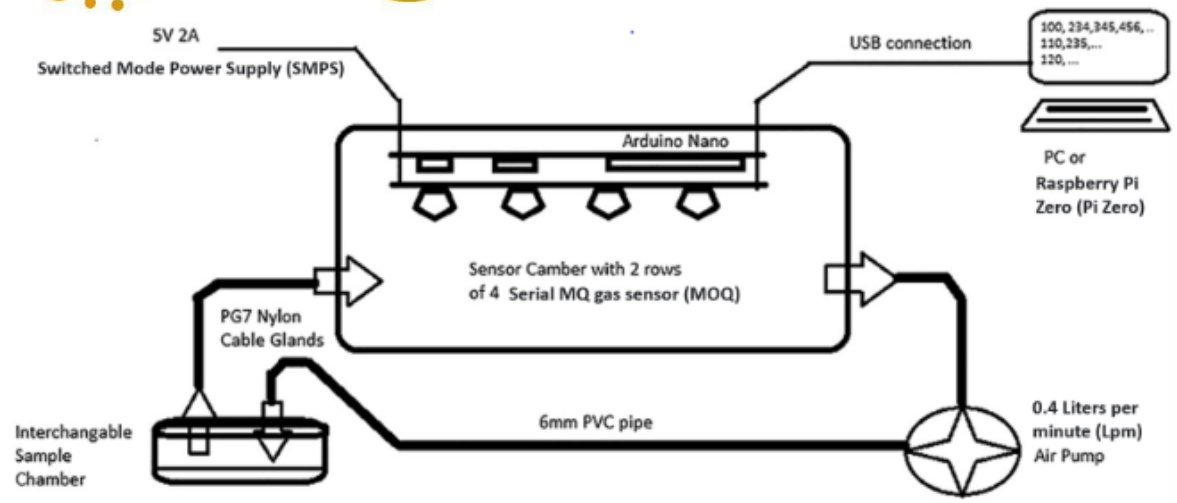


Figura 7. Esquema de la nariz electrónica. Fuente Oates *et al*., 2020.

Conclusiones.

En este documento se han descrito los puntos más importantes de un sistema de monitorización con acceso remoto de bajo coste y bajo consumo con tres sensores; temperatura, humedad y peso, así como una nariz electrónica para la detección de compuestos orgánicos volátiles.

La temperatura y la humedad ambientales son quizás los factores ambientales más importantes en la apicultura, afectando el comportamiento de la colmena. Por lo tanto, se justifica la instalación de una pequeña estación meteorológica tanto dentro como fuera de la colmena.

Respecto al peso de la colmena, intervalos de una hora o incluso con mayor frecuencia, mostrarían datos sobre el crecimiento y la actividad de la colmena, proporcionando información precisa sobre posibles eventos de las colonias como la enjambrazón, o permitiendo controlar cambios de peso debido al pecoreo y la lluvia.

Respecto al monitoreo de gases, mediante la nariz electrónica, en el interior de la colmena, destacar que es otro parámetro informativo a monitorear, que varía según el clima, la presión local, el número de abejas en la colmena o la salud de la colonia. Los componentes más importantes en este sentido son el dióxido de carbono, oxígeno y dióxido de nitrógeno, además, también es notable la medición de gases contaminantes. Una colonia sana indica un nivel estable de CO_2, mientras que un nivel bajo de CO_2 puede indicar una disminución de las abejas.

En términos de microcontroladores, una placa Arduino o compatible con Arduino como es el caso de este proyecto, que es un microcontrolador básico, es adecuada para proyectos de Internet de las cosas (IoT) para mediciones a tiempo real.

Por otro lado, el uso de redes de sensores inalámbricos para monitorear las colmenas no perturba la vida de la colmena. Por lo tanto, esta técnica es perfectamente adecuada para monitorear el estado de la colonia de abejas melíferas, con la mayor precisión posible, que es el objetivo básico de la apicultura inteligente.

Bibliografía

Bencsik M, Bencsik J, Baxter M, Lucian A, Romieu J, Millet M., 2011. Identification of the honey bee swarming process by analysing the time course of hive vibrations. Computers and Electronics in Agriculture 76(1):44-50. https://doi.org/10.1016/j.compag.2011.01.004.

Chen C., Yang E.C., Jiang J. A., Lin T.T., 2012. An imaging system for monitoring the in-and-out activity of honey bees. *Comput Electron Agric*, 89:100-109. https://doi.org/10.1016/j.compag.2012.08.006.

Fels D.I., Blackler A., Cook D., Foth M., 2019. Ergonomics in apiculture: A case study based on inspecting movable frame hives for healthy bee activities. Heliyon, 5, 7. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01973.

Gil-Lebrero S, Quiles-Latorre F, Ortiz-López M, Sánchez-Ruiz V, Gámiz-López V, Luna-Rodríguez J., 2017. Honey Bee Colonies Remote Monitoring System. Sensors, 17(1), 555. https://doi.org/10.3390/s17010055.

Goulson D., Nicholls E., Botias C., Rotheray E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science, 347(6229):1255957. https://doi.org/10.1126/science.1255957.

Jiang, J. A., Wang, C.H., Chen, C.H., Liao, M.S., Su, P., Chen, W.S., Huang, C.P., Yang, E.C., Chuang, C.L., 2016. A WSN-based automatic monitoring system for the foraging behavior of honey bees and environmental factors of beehives. Computers and Electronics in Agriculture, 123, 304-318. https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.03.003.

Klein S., Cabirol A., Devaud J.M., Barron A., Lihoreau, M., 2017. Why Bees Are So Vulnerable to Environmental Stressors. Trends Ecol Evol., 32 (4), 268-278. https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.12.009.

Kridi D.S., de Carvalho C.G.N., Gomes D.G., 2016. Application of wireless sensor networks for beehive monitoring and in-hive thermal patterns detection. Comput Electron Agric., 127, 221-35. https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.05.013.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2020. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/apicola/default.aspx (citado 3 de diciembre de 2020).

Murphy F.E., Popovici E., Whelan P., Magno M., 2015a. Development of an heterogeneous wireless sensor network for instrumentation and analysis of beehives. IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC) Proceedings. 2015, 346-51.

Murphy F.E., Magno M., Whelan P., Vici E.P., 2015b. b plus WSN: Smart Beehive for Agriculture, Environmental, and Honey Bee Health Monitoring - Preliminary Results and Analysis. En: 2015 IEEE Sensors Applications Symposium (SAS), 1-6.

Murphy, FE., Magno, M., O'Leary L., Troy, K., Whelan P., Popovici, EM., 2015c. "Big brother for bees (3B)-Energy neutral platform for remote monitoring of beehive imagery and sound," 2015 6th International Workshop on Advances in Sensors and Interfaces (IWASI), 2015, pp. 106-111. https://doi.org/ 10.1109/IWASI.2015.7184943.

Oates, M.J., Abu-Khalaf, N., Molina-Cabrera, C., Ruiz-Canales, A., Ramos, J., Bahder, B.W., 2020. Detection of Lethal Bronzing Disease in Cabbage Palms (Sabal palmetto) Using a Low-Cost Electronic Nose. Biosensors 2020, 10, 188. https://doi.org/10.3390/bios10110188.

Pérez N., Jesús, F., Pérez, C., Niell, S., Draper, A., Obrusnik, N., Zinemanas, P., Spina, Y.M., Letelier, L.C., Monzon, P. 2016. Continuous monitoring of beehives' sound for environmental pollution control. Ecol Eng., 90:326-30. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.082.

Rector B, Mercadier G, Holst N. 2008. Within-day variation in continuous hive weight data as a measure of honey bee colony activity. Apidologie, 39,(6), 694-707. https://doi.org/ 10.1051/apido:2008055.

Szabo TI. 1980. Effect of Weather Factors on Honeybee Flight Activity and Colony Weight Gain. J Apic Res., 19(3):164-71. https://doi.org/10.1080/00218839.1980.11100017.

Zacepins A, Pecka A, Osadcuks V, Kviesis A, Engel S., 2017. Solution for automated bee colony weight monitoring. Agronomy Research, 15 (2), 585-593.

Sesión 8:

Gestión del Agua, Nutrición y Energía en Horticultura.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Estimación de la huella de carbono: caso práctico en diez Comunidades de Regantes. Estrategias para su reducción.

S. Colino Jiménez [1], A. Melián Navarro [2] y A. Ruiz Canales [2]

[1] Master en Valoración, Catastro y Sistemas de Información Territorial. Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Ctra de Beniel km. 3,2 03312 Orihuela (Alicante) e-mail: scolino@gmail.com
[2] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO) Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Ctra de Beniel km. 3,2 03312 Orihuela (Alicante) e-mail: amparo.melian@umh.es acanales@umh.es

Resumen

Los gases de efecto invernadero (GEI) son los principales responsables del cambio climático y requieren un esfuerzo de contención por parte de todos. El dióxido de carbono (CO_2) es de los GEI el más destacado y el que mayor impacto genera en la variación global del clima de la Tierra, estando asociado en gran medida a las actividades humanas. El sureste español es un territorio con un gran potencial agrícola y líder en el uso eficiente del agua de riego. No obstante, la escasez del recurso y la necesidad de aumentar la disponibilidad hídrica mediante extracciones y bombeos hace que el consumo de energía incremente la huella de carbono de esta actividad.

En este trabajo se efectúa un análisis de la contribución y efectos ambientales (en $kgCO_2e/kWh$) de diez Comunidades de Regantes (CCRR) del sureste español a partir de la información obtenida del consumo eléctrico, medido en los equipos que intervienen en el manejo del agua de riego de las explotaciones y, en consecuencia, de su huella de carbono.

Estas CCRR presentan características muy diversas, no sólo en cuanto a ubicación, superficie regable y, cultivos principales, sino respecto al sistema de bombeo, permitiendo un análisis de las diferentes casuísticas. Así pues, algunas de ellas tienen una única impulsión, otras combinan varias impulsiones, pero con un único contador, y por último existen aquellas que disponen de diversos bombeos y también contadores independientes. Los datos de consumo en los diferentes periodos tarifarios se han obtenido mediante visita al campo y entrevistas a los responsables de las CCRR.

Para determinar el GEI equivalente ($kgCO_2e/kWh$) se parte del estudio de los periodos tarifarios (punta, valle y llano), y de los consumos eléctricos medidos de los equipos de impulsión y distribución en cada una de las CCRR. El índice de transformación se obtiene para cada periodo a partir de fuentes oficiales (Red Eléctrica de España, REE). Por último, se calcula las potenciales emisiones límite, las GEI mínimas y GEI máximas, para determinar cuál sería la menor huella de carbono posible, y en su defecto también la mayor, con el fin de evitarla, cubriendo las demandas hídricas de los cultivos si los bombeos se reprogramaran fuera del periodo actual. Para ello se analiza nuevamente el índice de transformación ($kgCO_2e/kWh$) según la información pública de REE, y su evolución a lo largo del tiempo, empleando diferentes escales temporales de acuerdo con los criterios de manejo del agua del regante.

Palabras clave: Gases de efecto invernadero (GEI), Comunidades de Regantes, consumo eléctrico, índice de transformación, periodo tarifario

Estimation of the carbon footprint: practical case in ten water user's associations (WUAs). Strategies for its reduction.

Abstract

Greenhouse gases (GHG) are the main responsible for climate change and require a containment effort on the part of all. Carbon dioxide (CO2) is the most prominent GHG and the one that generates the greatest impact on the global variation of the Earth's climate, being largely associated with human activities. The southeast of Spain

is a territory with great agricultural potential and a leader in the efficient use of irrigation water. However, the scarcity of the resource and the need to increase water availability through extraction and pump motor means that energy consumption increases the carbon footprint of this activity.

In this work, an analysis of the contribution and environmental effects (in kgCO2e / kWh) of ten water user's associations (WUAs) of southeastern Spain is based on the information obtained from electricity consumption, measured in the equipment involved in the management of the irrigation water for exploitation and, consequently, their carbon footprint.

These WUAs present very diverse characteristics, not only in terms of location, irrigable surface and main crops, but also with respect to the pumping system, allowing an analysis of the different cases. Thus, some of them have a single drive, others combine several drives but with a single meter, and finally there are those that have different pumps and also independent meters. The consumption data in the different tariff periods have been obtained through field visits and interviews with those responsible for the WUAs.

To determine the equivalent GHG (kgCO2e / kWh), we start from the study of the tariff periods (peak, valley and flat), and of the electrical consumption measured by the impulsion and distribution equipment in each of the WUA. The transformation index is obtained for each period from official sources (Red Eléctrica de España, REE). Finally, the potential limit emissions, the minimum GHG and the maximum GHG, are calculated to determine what would be the smallest possible carbon footprint, and failing that, also the largest, in order to avoid it, covering the water demands of the crops if pumps will be rescheduled outside the current period. For this, the transformation index (kgCO2e / kWh) is analyzed again according to the public information of REE, and its evolution over time, using different time scales in accordance with the criteria of irrigation water management.

Keywords: GHG emissions, water user's associations (WUAs), electricity consumption, transformation index y tariff period.

Objetivos

La huella de carbono identifica la cantidad de emisiones de GEI que son liberadas a la atmósfera como consecuencia del desarrollo de una actividad (UNFCC, 1998). Diversos proyectos europeos (CEE, 2013) plantean herramientas para determinar la huella de carbono en la agricultura y reducirla. Es objetivo de este trabajo estimar la emisión de GEI por diez Comunidades de Regantes (CCRR) del sureste español a partir del análisis de la energía consumida por los equipos de bombeo empleados para el riego.

Las comunidades de regantes objeto de estudio representan las explotaciones agrícolas más comunes y con las casuísticas más habituales, en cuanto a tipos de cultivos presentes e infraestructuras de riego, instaladas en los campos del sureste español.

El análisis de los resultados obtenidos en el cálculo de emisiones GEI para cada caso de estudio, nos posibilitará obtener conclusiones cuantitativas acerca del grado de optimización de la gestión de recursos hídricos, de manera global desde un punto de vista de emisiones GEI para cada comunidad, y la evaluación de la distribución por periodos tarifarios de la política de riego implantada.

Como segundo objetivo establecemos el coste de las emisiones GEI que se incurre en cada Comunidad de Regantes con base en los derechos de emisiones de CO_2. Cumplir con el protocolo de (Kioto

UNFCC, 1998) lleva a formular los derechos de emisión de CO_2, de manera que si se actúa de forma correcta se reporta un resultado económico. Los derechos de emisión de CO_2 adquieren valor de mercado y se comercializan.

Situación

La cuantificación de la huella de carbono generada en el manejo del agua de riego se aplica a diez casos concretos que se somete a estudio y comparación de resultados. Estas diez Comunidades de Regantes se distribuyen en el ámbito Comunidad Valenciana y Región de Murcia (ocho CCRR en la provincia de Alicante, una en la de Valencia y otra en Murcia)

Con objeto de preservar la privacidad de los datos y en particular de las Comunidades de estudio, se asigna un identificador a cada entidad obviando los nombres propios de las mismas. La muestra está compuesta por una representación particular de la zona, presentando variabilidad de tamaños y tipos de cultivos característicos del entorno.

La ubicación de las CCRR y su situación geográfica es la siguiente (Figura1). Su ubicación condiciona sus características agroclimáticas y las necesidades hídricas de sus cultivos.

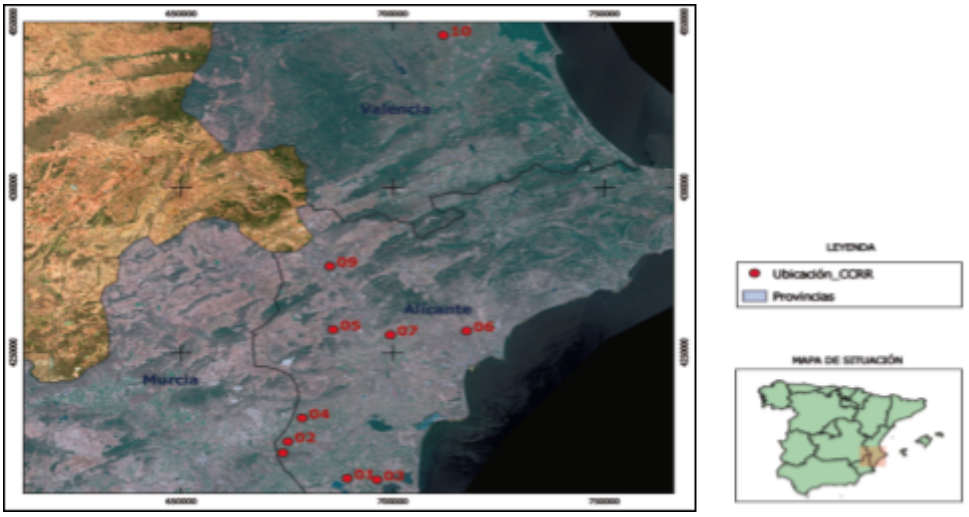


Figura 1. Ubicación geográfica "aproximada" de las CCRR.

Descripción

La metodología de cálculo de emisiones GEI de este trabajo se basa en la propuesta por Munuera (2019) para lo cual se requiere disponer de información precisa y detallada del consumo energético de cada bombeo. Tras la visita a campo y medición de consumos, así como entrevistas a los responsables de las CCRR, se obtienen los registros del consumo de energía eléctrica dispuestos por periodos mensuales, y en los respectivos periodos tarifarios (punta, valle y llano) lo cual nos permite tras su correspondiente análisis determinar en qué periodo sería conveniente realizar el riego para minimizar las emisiones GEI. El consumo energético se mantiene, las emisiones, para un mismo consumo de energía puede minimizarse si se eligen periodos tarifarios con índice de trasformación (kgCO2e/kWh) bajo.

El consumo de energía eléctrica medido y registrado, corresponde a los equipos que intervienen en el manejo de agua; su extracción y su distribución.

En la siguiente ilustración se presenta el Esquema Principal de Procedimientos. Diagrama de flujo de trabajo, el cual nos permite tener una visión integral de las tareas desarrolladas.

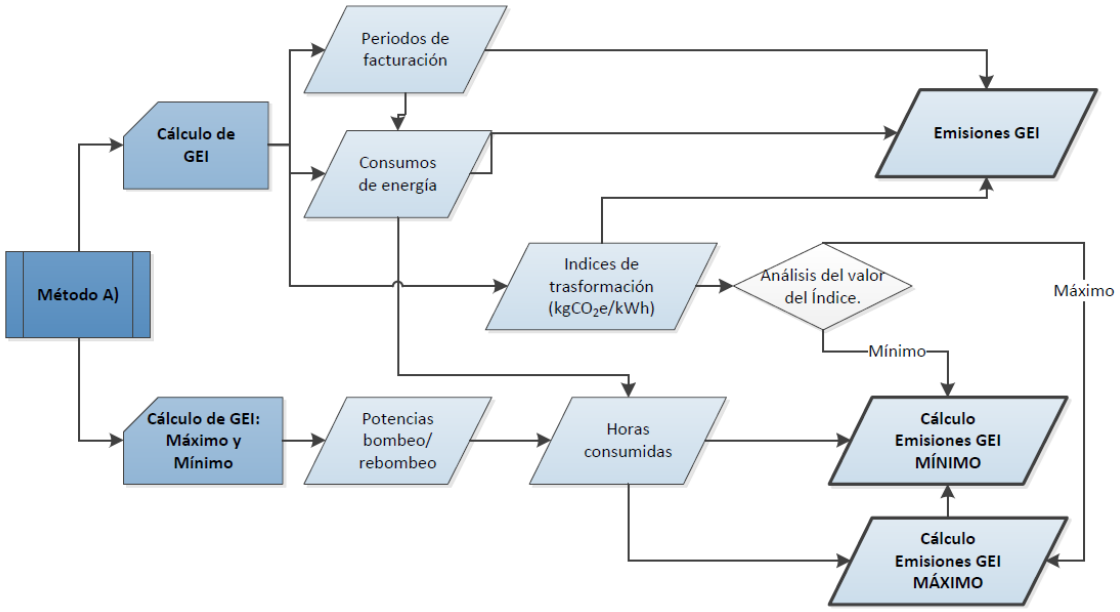


Figura 2. Esquema de cálculo de emisiones GEI

La información general se recopila por Comunidades de Regantes en tablas independientes y registros concretos con objeto de tener cada dato registrado en un solo campo, y así poder programar y automatizar los posteriores cálculos.

Fundamental para el éxito del trabajo es que los consumos de energía eléctrica registrados, se dispongan estructurados y detallados en cada una de las auditorias para cada Comunidad de Regantes. Para ello es requisito considerar y determinar los siguientes conceptos:

- Se establecen **periodos de facturación** mensuales, disponiendo de 12 periodos mensuales en cada auditoria. Cada hora de consumo de electricidad se "cataloga" en un **periodo tarifario,** (P1, P2, …, P6). Cada período corresponde a una franja horaria diaria donde el precio de la energía y de la potencia es diferente
- La **energía consumida**, puede ser **activa** o **reactiva**. La energía reactiva es aquella que generan algunas maquinarias para crear el campo electromagnético y eléctrico que necesitan para funcionar. Por otro lado, la energía activa es aquella que puede convertirse en trabajo mecánico y calor. En el registro de los consumos de energía disponibles en cada una de las auditorias de las diferentes Comunidades de Regantes, disponemos de consumos de ambas energías.
- El **índice de transformación** es un factor numérico que relaciona la energía consumida por una actividad con la cantidad de emisiones GEI asociada a su generación, por ejemplo: kgCO2e/kWh. La elección del momento de consumir energía para el riego está influenciada directamente por los períodos tarifarios, por ello, se dispone de un índice de transformación de la energía eléctrica mensual para la serie de años analizada (2013-2019) distinguiendo por períodos tarifarios. Utilizamos los datos ofrecidos por Red Eléctrica de España (REE) en su página *web* (www.ree.es), Índices de transformación mensuales en cada período, Punta, llano y valle (kgCO2e/kWh) correspondientes a cada año auditado.

Atendiendo a los conceptos anteriores, realizamos la operación de multiplicar el consumo de energía eléctrica (activa, reactiva) de cada periodo de facturación (mes) en cada periodo tarifario (P1, P2 y P3) por el índice de trasformación correspondiente a ese mes y periodo tarifario respectivamente. De esta manera obtenemos la emisión GEI generada.

Resulta de interés cuantificar cuál sería la menor y mayor huella de carbono posible generada. Establecer umbrales mínimos y máximos potenciales en el manejo del agua de riego. Para este fin se consideran los períodos de tiempo (periodos tarifarios) en los que los índices de transformación son menores. A partir de este dato se determinan los períodos de tiempo más aconsejables para poner en funcionamiento los sistemas de manejo de agua de riego, con el objetivo de reducir las emisiones GEI vinculadas a esta actividad.

Se parte de los consumos de energía generados en cada periodo tarifario de cada periodo de facturación (mes). Requerimos conocer las horas de utilización de los sistemas de manejo de agua de riego, es decir, se precisa calcular las horas consumidas en cada periodo tarifario, y para ello relacionamos los consumos de energía con la potencia de los propios sistemas.

Posteriormente deducimos el índice de trasformación menor de entre los tres periodos tarifarios. Ese periodo se corresponde con el más favorable para conseguir una reducción en las emisiones GEI. Por el contrario, el índice de trasformación mayor de entre los tres periodos tarifarios supone el periodo en el que se aumentan las emisiones GEI vinculadas. Finalmente, multiplicando este índice de trasformación (menor y mayor) por los consumos de energía en cada periodo de facturación, obtenemos los valores de emisiones GEI mínimos y máximos respectivamente.

Resultados y Discusión

La labor previa de homogeneización en forma y disposición del amplio extracto de información recopilada de cada Comunidad de Regantes se resume en la tabla 1.

Para cada CCRR se presenta el número de bombeos que tiene instalados y si los contadores que registran los consumos de energía son independientes para cada bombeo o por el contrario se dispone de un contador global para toda la red/sistema de riego. Las características técnicas de cada bombeo, como potencia y altura, datos requeridos para el objeto del cálculo también son tabuladas junto a las particularidades de los terrenos, superficie regable y tipos de cultivos.

Los diferentes tipos de cultivos presentes en los casos prácticos sometidos a estudio, sumado a las múltiples configuraciones y disposiciones de los sistemas de bombeo nos aportan la expectativa de obtener resultados de alta variabilidad.

La **situación actual** se refleja en la tabla que a continuación se expone, tabla 2, muestra el valor de las emisiones GEI, a partir del registro de consumo de energía eléctrica correspondiente al manejo del agua de riego en cada CCRRs y sus respectivos contadores, en función de los distintos periodos tarifarios. Los datos presentados son datos anuales (aunque los cálculos se han realizado por meses, considerando el índice de transformación mensual). En esta tabla se observa las emisiones correspondientes a potencia activa (GEI activa), distinguiendo en periodos punta, valle y llano, y potencia reactiva. Por otra parte, se comparan los valores obtenidos GEI total (KgCO2e), con la menor y mayor huella de carbono posible, cubriendo las demandas hídricas de los cultivos, en ambos casos de estudio, con el riego suministrado. Estrictamente se analiza para la demanda satisfecha con independencia de si realmente se cubren todas las necesidades de riego al ser una zona caracterizada por una escasez de agua endémica y no todos los años se logra suministra los requerimientos de los cultivos.

Tabla 1. Caracterización de las CCRRs. Principales datos relativos a bombeos y cultivos (superficie regable).

CCRRs	*Equipos bombeo*	*Contador*	*Potencia motor (kW)*	*Altura (m)*	*Superficie regable (ha)*	*Cultivos*
CCRR 1					*1.796,78*	*Cítricos (100%)*
	1	*Global*	*648*	*59,16*		
	2		*55*	*41,71*		
	3		*162*	*71,73*		
CCRR 2					*778,37*	*Cítricos (100%)*
	1	*Global*	*177*	*106,57*		
	2		*365,2*			
	3	*Independiente*	*90*	*22,39*		
	4	*Independiente*	*182*	*71,41*		
CCRR 3					*1.747*	*Cítricos (97,5%),*
	1	*Independiente*	*160*	*52,39*		*Patata (1,25%),*
	2	*Independiente*	*666*	*74,55*		*Alcachofa (1,25%)*
CCRR 4					*1.400*	*Cítricos (97,5%)*
	1	*Global*	*566*	*128,74*		*Granada (2,5%)*
	2		*41,5*	*21,92*		
CCRR 5					*1.130*	*Vid (100%)*
	1	*Global*	*150*	*160*		
	2		*90*	*60*		
CCRR 6					*1.085*	*Cítricos (25%),*
	1	*Independiente*	*510*	*44*		*Patata (25%), Melocotón (25%), Olivo (25%)*
CCRR 7					*2.000*	*Vid (95%);*
	1	*Global*	*496,6*	*91*		*Cereales,*
	2			*14*		*Patata*
	3			*45*		*Olivo (5%)*
CCRR 8					*310*	*Cítricos (100%)*
	1	*Independiente*	*258,18*			
	2	*Independiente*	*240*			
	3	*Independiente*	*45,39*			
	4	*Independiente*	*375*			
CCRR 9					*1.730*	*Patata (20%),*
	1	*Independiente*	*102,92*	*51,43*		*Olivo (20%),*
	2	*Independiente*	*140,7*	*171,73*		*Vid (20%)*
	3	*Independiente*	*290,13*	*145,665*		*Almendro, (20%)*
	4	*Independiente*	*397,02*	*171,6,*		*Melocotón (20%)*
	5	*Independiente*	*375,05*	*283*		
	6	*Independiente*	*190,77*	*262.79*		
CCRR 10					*593*	*Cítricos (30%)*
	1	*Independiente*	*75*	*35*		*Melocotón (20%),*
	2	*Independiente*	*75*	*35*		*Kaki (30%)*
	3	*Independiente*	*75*	*80*		

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Emisiones GEIs (KgCO2e) según potencia activa y reactiva por CCRRs y potencial de emisiones GEI s/ Máximo y mínimo.

CCRRs	***GEI activa***			***GEI reactiva***	***GEI total (KgCO2e)***	***GEI min (KgCO2e)***	***GEI max (KgCO2e)***
	P1	***P2***	***P3***				
CCRR 1	*81.769*	*134.690*	*223.235*	*259.239*	***698.932***	*681.461*	*717.073*
CCRR 2	*192.604*	*100.507*	*804.859*	*554.682*	***1.652.652***	*1.596.074*	*1.690.063*
	189.128	*78.778*	*608.234*	*381.812*	***1.257.952***	*1.216.525*	*1.287.801*
	622	*1.301*	*8.735*	*12.033*	***22.691***	*21.859*	*23.240*
	2.854	*20.428*	*187.890*	*160.837*	***372.009***	*357.690*	*379.022*
CCRR 3	*283.216*	*109.816*	*139.732*	*190.615*	***723.379***	*706.887*	*748.739*
	95.234	*19.217*	*54.671*	*57.546*	***226.668***	*222.292*	*232.092*
	142.490	*81.420*	*139.732*	*133.069*	***496.711***	*484.595*	*516.647*
CCRR 4	*80.297*	*238.831*	*162.027*	*262.321*	***743.476***	*725.209*	*769.034*
CCRR 5	*6.256*	*23.252*	*85.170*	*49.584*	***164.262***	*158.752*	*177.133*
CCRR 6	*12.508*	*26.863*	*28.948*	*11.500*	***79.819***	*77.121*	*84.175*
CCRR 7	*48.323*	*126.936*	*193.860*	*195.037*	***564.156***	*537.027*	*602.113*
CCRR 8	*27.075*	*51.776*	*58.860*	*48.933*	***186.644***	*182.301*	*192.463*
	1.383	*3.455*	*5.703*	*2.928*	***13.469***	*13.223*	*13.969*
	18.448	*35.438*	*42.279*	*37.563*	***133.728***	*130.690*	*137.982*
	986	*2.023*	*2.441*	*1.414*	***6.864***	*6.701*	*7.098*
	6.258	*10.860*	*8.437*	*7.028*	***32.583***	*31.687*	*33.414*
CCRR 9	*154.571*	*237.192*	*1.423.560*	*771.588*	***2.586.911***	*2.548.322*	*2.695.537*
	1.005	*14.760*	*34.514*	*13.897*	***64.176***	*63.184*	*67.167*
	87.766	*105.041*	*304.064*	*241.279*	***738.150***	*722.500*	*767.943*
	61.196	*93.430*	*266.169*	*149.465*	***570.260***	*560.052*	*590.274*
	2.742	*10.142*	*208.791*	*120.838*	***342.513***	*338.459*	*358.180*
	942	*8.857*	*410.407*	*153.611*	***573.817***	*568.818*	*600.136*
	920	*4.962*	*19.915*	*92.498*	***297.995***	*295.309*	*311.837*
CCRR 10	*7.2698*	*85.379*	*75.569*	*28.150*	***196.366***	*191.816*	*204.363*
	895	*32.382*	*32.795*	*1.772*	***67.844***	*66.097*	*70.090*
	1.849	*44.367*	*31.479*	*5.505*	***83.200***	*81.420*	*86.910*
	4.524	*8.630*	*11.295*	*20.873*	***45.322***	*44.299*	*47.363*

Fuente: Elaboración propia. *(P1 es horas punta, P2 horas llano y P3 horas valle).*

Las emisiones por potencia reactiva suponen casi un 30% de las emisiones totales, lo que significa que se está perdiendo mucha energía, y por tanto son emisiones que se pueden reducir potencialmente modificando el sistema de riego instalado.

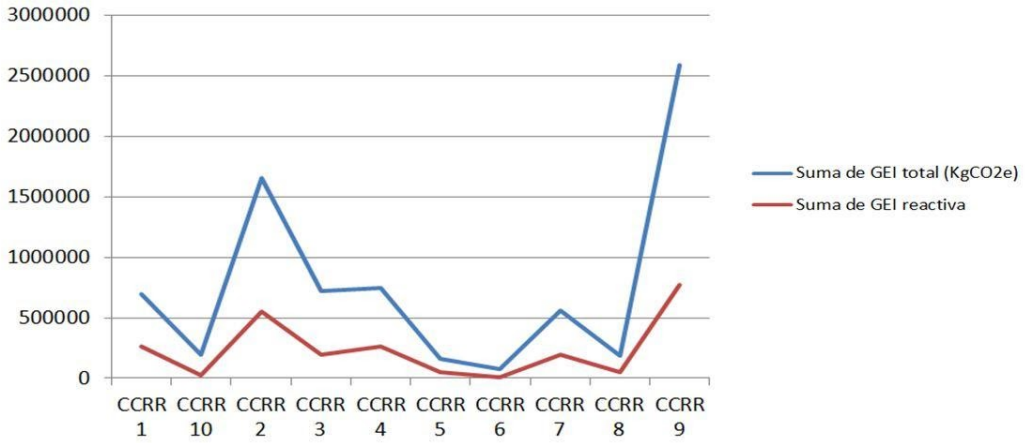


Figura 3. Suma de Emisiones GEI (KgCO2e) total frente a la suma de emisiones GEI (KgCO2e) generada por la energía reactiva.

Analizando los resultados de Emisiones GEI (KgCO2e) totales, se observa como las Comunidades de Regantes 2 y 9, cuadruplica y triplica respectivamente, las emisiones GEI por superficie regada, al resto de comunidades.

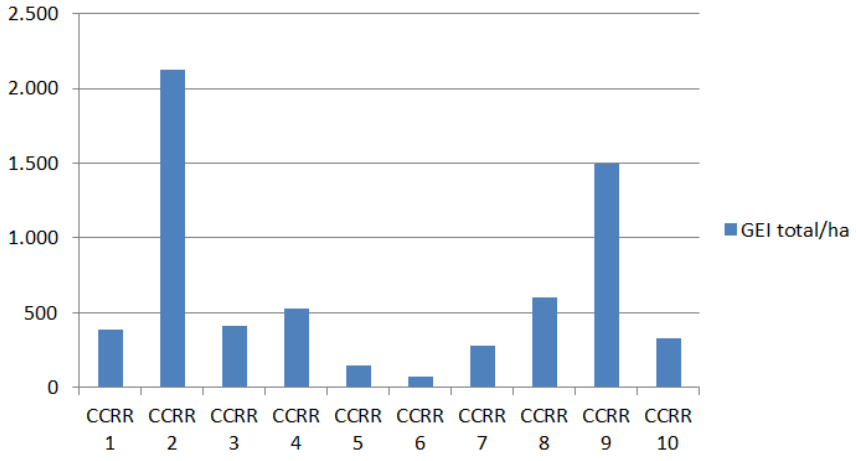


Figura 4. Emisiones GEI totales (KgCO2e) por unidad de superficie regada.

La necesidad hídrica varía respecto de cada tipo de cultivo, teniendo en consideración este factor, hacemos el análisis específico de las comunidades en las que más del 95% de la superficie es cultivada con cítricos, (CCRR-1, CCRR-2, CCRR-4 Y CCRR-8) se observa como la CCRR-2 mantiene su exceso de emisiones GEI respecto al resto de comunidades en igualdad de requisitos hídricos.

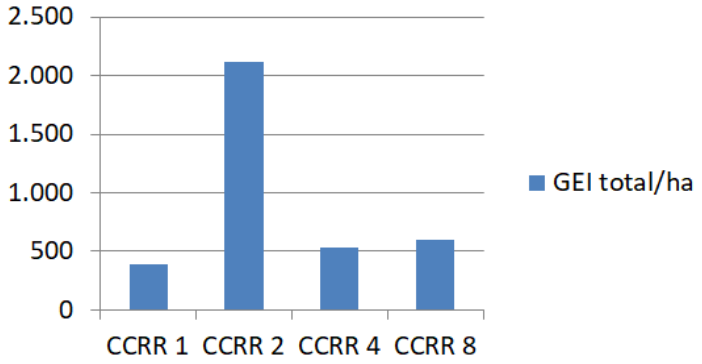


Figura 5. Emisiones GEI totales (KgCO2e) por unidad de superficie regada en cuatro comunidades de Regantes (más del 95% de la superficie cultivada de cítricos).

Análisis y propuesta de optimización.

Centrándonos en las diferencias entre la emisión GEI total de cada CCRR, y su mínimo y máximo calculados, tenemos que los valores resultantes de la relación nos permiten analizar si la comunidad tiende a optimizar los recursos y favorecer la sostenibilidad ambiental reduciendo las emisiones GEI o por el contrario desarrolla prácticas que provocan emisiones GEI altas. Los valores menores que 1 representan aquellas comunidades que emiten emisiones GEI muy próximas a los valores de emisiones mínimos. Si el valor es mayor de la unidad, las emisiones GEI tienden a acercarse a los valores máximos, por consiguiente, si el valor es próximo a la unidad muestra que las emisiones GEI son el valor medio entre el mínimo y máximo.

En la figura 3 se evidencia que la CCRR-2 realiza emisiones GEI totales con tendencia a su máximo establecido, lo que implica que el riego en esta CCRR se ajusta a periodos tarifarios en los que las emisiones GEI suponen un alto coste para el medio ambiente. Sería positivo introducir una mejora de manejo del riego más sostenible.

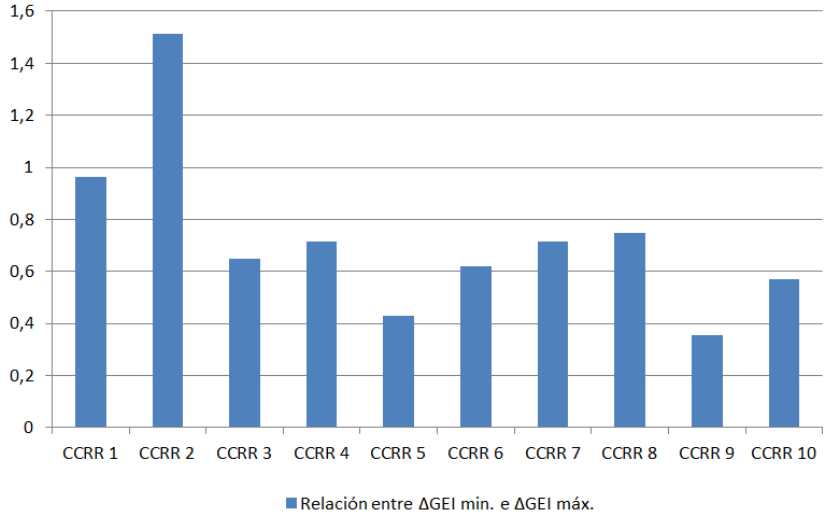


Figura 6. Relación de los incrementos entre emisión GEI total de cada CCRR, y su mínimo y máximo.

Repercusión de las emisiones en costes.

El mercado del carbono fija cupos de emisiones a los mayores emisores europeos para permitir a los que reducen sus emisiones vender sus excedentes a quienes no consiguen disminuirlas (MITECO).

Con base a los derechos de emisiones de CO_2, (SENDECO) establecemos el coste de las emisiones GEI en las que se incurre en cada Comunidad de Regantes.

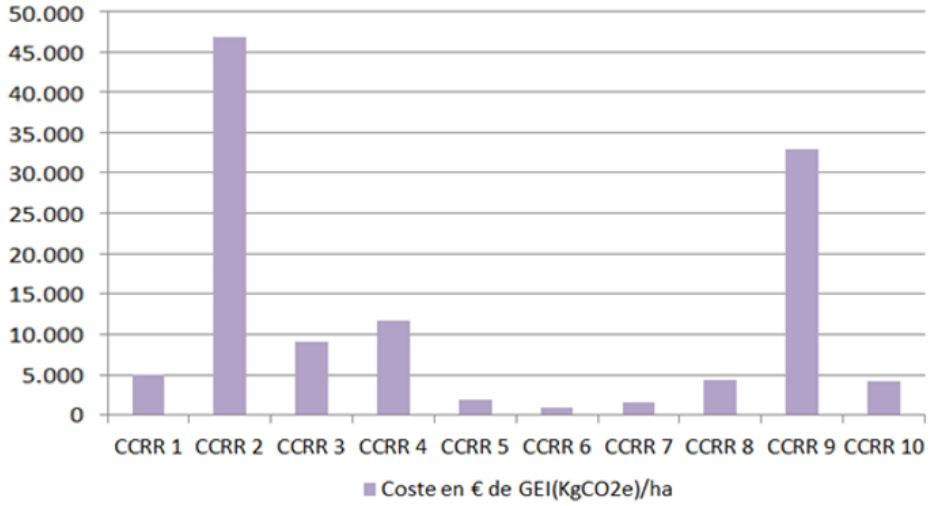


Figura 7. Coste económico de las emisiones GEI totales por ha de cada CCRR.

Las emisiones generan un coste para la sociedad, el cual manifiesta los daños causados por las emisiones de estos gases, con el objeto de orientar las decisiones de los agentes económicos hacia soluciones de bajas emisiones. El coste económico que suponen las emisiones GEI por unidad de superficie para la CCRR-2 y CCR-9, manifiesta una actividad extrema, total discrepancia entre la cantidad de emisiones y la cantidad de producto generado.

Conclusiones

La elección del momento de consumir energía para el manejo del agua para riego (extracción de agua y aplicación a los cultivos), está condicionada en gran parte por el precio de la energía. Los agricultores eligen los períodos más económicos para consumir energía eléctrica convencional, evitando en la medida de lo posible los períodos más caros. Pero este criterio de elección horaria no es la que menor huella de carbono genera en la mayoría de los casos analizados. Invertir este proceso y lograr una reducción de la huella de carbono es un trabajo de todos y una estrategia a considerar.

Realizar un cambio, una modernización de los sistemas de riego supone un coste inicial para el propietario, si bien a largo plazo, este coste se ve compensado en las dos vertientes; ahorro económico en la factura mensual para el consumidor y reducción de emisiones GEI, lo que a su vez implica contribuir al desarrollo sustentable evitando el calentamiento de la Tierra.

Referencias

Comisión Europea. 2013. AgriClimateChange – Combating climate change through farming: application of a common evaluation system in the 4 largest agricultural economies of the EU LIFE09 ENV/ES/00044, Bruselas.

Munuera, A., 2019. Determinación de la huella de carbono derivada del consumo de energía eléctrica convencional para el uso de agua de riego. Universidad de Castilla La Mancha. Albacete

REE Red Eléctrica Española. Demanda de energía eléctrica en tiempo real, estructura de generación y emisiones de CO_2. Disponible en: https://demanda.ree.es/visiona/seleccionar-sistema.

https://www.miteco.gob.es/es/cambio-climatico/temas/mitigacion-politicas-y-medidas/calculadoras.aspx. MITECO, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Aplicaciones para el cálculo de emisiones GEI de una organización.

https://www.miteco.gob.es/es/cambio-climatico/temas/comercio-de-derechos-de-emision/not_apl_ce_tcm30-178296.pdf. MITECO, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. El Comercio de derechos de emision en España.

https://www.sendeco2.com/es/precios-co2 (accessed on 10 july 2020). SENDECO. Sistema europeo de negociación de C02.

UNFCC. 1998. Kyoto Protocol to the United Nations Framework. Rev Eur Community Int Environ Law, 7, 214–217. doi: 10.1111/1467-9388.00150.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Obtención automática del punto de capacidad de campo a través de sensores de humedad de suelo

M. Soler-Méndez [1], D. Parras-Burgos [2], A. Cisterne-López [1], E. Mas-Espinosa [1], Diego S. Intrigliolo [3] y J.M. Molina-Martínez [1]

[1] Grupo de investigación de Ingeniería Agromótica y del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena, C/ Ángel s/n, Ed. ELDI E1.06, 30203, Cartagena, Murcia. manuel.ia@agrosolmen.es, adriancisterne@gmail.com, masespinosa.estefania@gmail.com, josem.molina@upct.es

[2] Departamento de Estructuras, Construcción y Expresión Gráfica, Universidad Politécnica de Cartagena, C/ Doctor Fleming s/n, 30202, Cartagena, Murcia. dolores.parras@upct.es

[3] Departamento de Ecología, Centro de Investigaciones sobre Desertificación (CIDE), (CSIC-UV-GVA), Carretera CV-315, km 10.7, 46113 Moncada, Valencia. Diego.intrigliolo@csic.es

Resumen

La optimización del uso de los recursos hídricos es primordial en el sureste español. Empleando la tecnología disponible destinada a monitorizar el consumo de agua y el estado hídrico del suelo se puede lograr el ajuste óptimo del empleo del agua de riego. Con el objetivo de facilitar al usuario el empleo de esta tecnología, en este trabajo se desarrolla una metodología para analizar las curvas de humedad de suelo mediante sensores. A través de este método se consigue automatizar el reconocimiento del punto de humedad que corresponde a la capacidad de campo del suelo, ayudando de esta forma a ajustar el programa de riego de forma autónoma. Por otro lado, esta metodología puede mostrar también la evolución de la capacidad de campo del suelo a lo largo del ciclo de cultivo, que cambiará debido a distintos factores, principalmente la compactación y la reestructuración por la degradación de la materia orgánica y el desarrollo radicular.

Palabras clave: Capacidad de campo, automatización de riego, sensores de humedad, tecnología de riego

Automatic obtaining of the field capacity point through soil moisture sensors

Abstract

Optimizing the use of water resources is essential in the southeast of Spain. Using the available technology to monitor water consumption and thewater status we can achieve an optimal adjustment of the irrigation water use. Seeking to facilitate the adoption of these technologies by the end-users, in this work a methodology is developed to analyze the soil moisture curves using sensors. With this method, it is possible to automate the recognition of the humidity point that corresponds to the field capacity of the soil, thus helping to adjust the irrigation program autonomously. This methodology can also show the evolution of the field capacity of the soil throughout the cultivation cycle, which will change due to different factors, mainly compaction and restructuring due to the degradation of organic matter and root development.

Keywords: Field capacity, irrigation automation, soil humidity sensors, irrigation technology.

Introducción y/o Justificación

Debido a la escasez de recursos hídricos en las zonas agrícolas de climas semiáridos, concretamente en el sureste español, y siendo un factor productivo indispensable, con una adecuada gestión del agua de riego se puede mejorar la productividad de las explotaciones agrarias (Juan et al., 1996). Con el empleo de sensores de monitorización de distintas variables agroclimáticas conectados a equipos de adquisición de datos, basados en el empleo de las Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC´s), se obtiene información que permite estimar las necesidades hídricas de los cultivos (Soler-Méndez et al., 2019; Soler-Méndez et al., 2021).

Una de las variables cuyo costo de monitorización es asequible económicamente es la humedad del suelo, que puede medirse a través de múltiples tipos de sensores de humedad. La gestión de riego puede optimizarse con el empleo de este tipo de sensores (El-Naggar et al., 2020; Liao et al., 2021; Martínez-Gimeno et al., 2020), teniendo en cuenta que son puntos de interés para un adecuado manejo del riego tanto la capacidad de campo como el punto de marchitez permanente y el nivel de agotamiento permisible (Zinkernagel et al., 2020). La definición de la capacidad de campo establecida por la FAO (FAO) está fuertemente influenciada por la estructura del suelo, indicando que se advierte para suelos bien estructurados a las 48 horas de haber saturado el suelo; sin embargo, Pachés Giner (Pachés Giner, 2019) simplifica el concepto: "*la capacidad de campo corresponde a la máxima cantidad de agua que un suelo puede retener en contra de la acción de la gravedad*".

Los valores absolutos ofrecidos por estos sensores no coinciden con la realidad, pues requieren de una calibración que no suele estar al alcance de los usuarios comerciales, pero conociendo la evolución continua de los valores, se pueden tomar decisiones en cuanto a la gestión de riego que son técnicamente viables (Thompson et al., 2007). Mediante el análisis del valor mínimo diario más alto del contenido de agua del suelo registrado por un sensor, en un periodo de referencia durante el tiempo en el que se considera que el suelo está a capacidad de campo (Domínguez-Niño et al., 2020), se consigue empíricamente el valor de contenido volumétrico de agua del suelo ofrecido por el sensor a capacidad de campo. Gráficamente la tendencia de la humedad del suelo ofrecida por un sensor en la que se considera la capacidad de campo coincide con lo propuesto por Zotarelli *et al*. (Zotarelli et al., 2013) que presentan una metodología gráfica para conseguir el punto de capacidad de campo de un suelo arenoso mediante las curvas continuas de datos procedentes de sensores de humedad, donde se observa un cambio en la pendiente de pérdida de humedad del suelo, asemejable a dos rectas que se cruzan en un punto de inflexión, considerado como el punto de capacidad de campo.

En diferentes estudios se ha demostrado que el empleo de sensores de humedad reduce el consumo de agua y mejora la productividad por m^3 de agua consumida (El-Naggar et al., 2020; Liao et al., 2021; Martínez-Gimeno et al., 2020), por tanto, se puede considerar clave la obtención del punto de capacidad de campo para el correcto manejo de su información. El objetivo de este trabajo es conseguir un algoritmo que permita automatizar la búsqueda del punto de capacidad de campo de forma autónoma.

Material y Métodos

Los datos necesarios para poder desarrollar el algoritmo de detección automática de la capacidad de campo se han obtenido a partir de un ensayo desarrollado en una finca comercial situada en el término municipal de Lorca (Murcia, España). El cultivo del ensayo fue "Espárrago Brócoli, Burgundy", con un ciclo de cultivo entre el 1 de diciembre de 2020 y el 15 de marzo de 2021, con acolchado plástico, con separación entre hileras de 90 cm, 2 filas de planta por hilera y 35 cm de separación entre plantas. El sistema de riego fue localizado. La monitorización se llevó a cabo mediante un sensor de humedad

de suelo MAS1 de DECAGON, con salida analógica 4-20mA, conectado a un datalogger MICROCOM TCR-200, con lecturas minutales.

En el momento en el cual el suelo llega a su capacidad de campo, es capaz de retener todo el agua, y por tanto, deja de drenar (Pachés Giner, 2019). Ese momento se deduce en el cambio de pendiente de la pérdida de humedad del suelo mostrada por los datos de un sensor de humedad.

A lo largo del ciclo del ensayo se establecieron distintas fases de riego en exceso y posterior secado, con el fin de detectar la evolución de los sensores monitorizando la siguiente variable:

Variable 1: contenido volumétrico de agua del suelo (SWC), expresado en porcentaje de humedad de suelo, determinado por la sonda MAS1 empleada.

A partir del análisis de esta información, se establece una segunda variable:

Variable 2: variación del contenido volumétrico de agua del suelo (ΔSWC), expresado en porcentaje de humedad de suelo, calculado con la siguiente ecuación:

$$\Delta SWC_i = SWC_i - SWC_{i-1} \quad (1)$$

Esta variable será la que permita conocer la pendiente de variación de contenido volumétrico de agua del suelo, y compararla con las consignas alcanzadas en el desarrollo de este algoritmo.

Para alcanzar la capacidad de campo, un suelo ha tenido que saturarse previamente, y perder el exceso de agua que no es capaz de retener por drenaje. Así, se localiza la situación de drenaje comprobando que la variación del contenido volumétrico de agua es menor de un determinado valor, que se establece mediante la siguiente constante:

Constante 1: Variación de contenido volumétrico de agua del suelo límite que se considera drenaje (ΔSWC_{dren}), estableciendo esta constante con el siguiente valor empírico:

$$\Delta SWC_{dren} = -\ 0{,}10\% \quad (2)$$

Si esta condición se cumple durante un tiempo determinado, entonces se considera que efectivamente se está produciendo un drenaje. Así, se iniciará la iteración de búsqueda del punto de capacidad de campo, analizando la variación en el contenido volumétrico de agua del suelo. Este tiempo se establece con esta constante:

Constante 2: Tiempo de detección de la condición de evento de drenaje (t_{dren}), y tiene un valor empírico indicado a continuación:

$$t_{dren} = 4 \text{ minutos} \quad (3)$$

El inicio de la búsqueda de la capacidad de campo aparece cuando se cumple la condición antes indicada:

$$(\Delta SWC_{i\text{-}tdren}: \Delta SWC_i) < \Delta SWC_{dren} \quad (4)$$

Para buscar la capacidad de campo, se examina que la variación del contenido volumétrico de agua sea negativa (se esté produciendo drenaje), pero sea superior al límite establecido por la siguiente constante.

Constante 3: Variación del contenido volumétrico de agua del suelo donde se considera que el drenaje está cesando, y se alcanza la capacidad de campo (ΔSWC_{CC}), y toma el siguiente valor experimental:

$$\Delta SWC_{CC} = -\ 0{,}01\% \quad (5)$$

Se tiene que dar esta condición durante un tiempo, para asegurarse que se está alcanzando el final del drenaje, y ese tiempo se establece por la siguiente constante:

Constante 4: Tiempo de detección de la condición de parada de drenaje (t_{CC}), y tiene el siguiente valor experimental:

$$t_{CC} = 6 \text{ minutos} \quad (6)$$

Se encuentra el contenido volumétrico de agua del suelo considerado como que está a capacidad de campo cuando se cumple la siguiente condición:

$$0 \geq (\Delta SWC_{i\text{-}tcc}: \Delta SWC_i) > \Delta SWC_{CC} \quad (7)$$

En ese momento, se consigue el valor de la variable que se describe a continuación:

Variable 3: Contenido volumétrico de agua del suelo a capacidad de campo (SWC_{CC}), expresado en porcentaje de agua en el suelo, y toma la siguiente expresión justo en el momento en que se cumple la condición 7:

$$SWC_{CC} = SWC_i \quad (8)$$

A partir de este punto, se cumplirá que se mantiene constante la variable 3 hasta que no se encuentre otro nuevo punto de búsqueda de la capacidad de campo tras un evento de drenaje.

$$SWC_{CC} = SWC_{CCi} \quad (9)$$

Resultados y Discusión

A continuación, se muestra en la siguiente figura la evolución de los datos de contenido volumétrico de agua obtenidos a través de la sonda de humedad MAS1 utilizada.

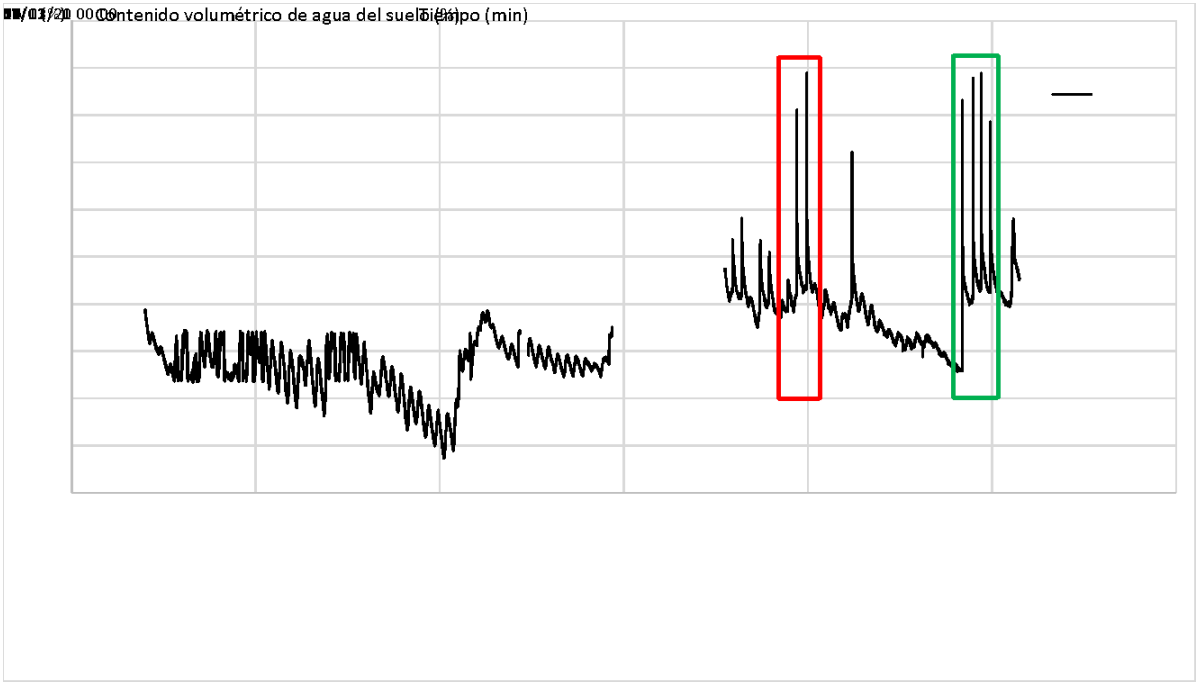


Figura 1. Evolución del contenido volumétrico de agua del suelo. En rojo se indica el primer evento de estudio, y en verde, el segundo.

En relación a la Figura 1, se destacan dos períodos concretos en los que se produjo un riego significativo que conllevó un posterior drenaje destacable con el que proceder a su estudio. El primer

período (zona roja) corresponde con los días 11 y 12 de febrero. Por otro lado, el segundo episodio de estudio se produjo en los días 1, 2, 3 y 4 de marzo.

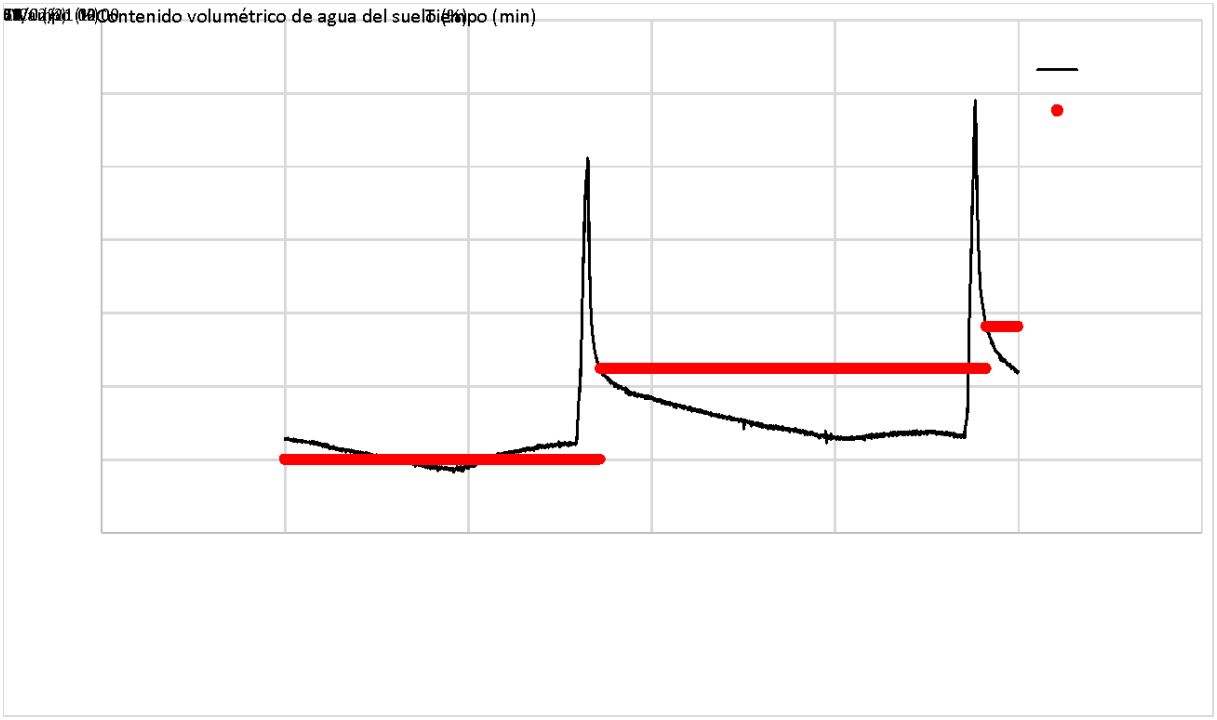


Figura 2. Evolución del contenido volumétrico de agua del suelo entre el 11 y el 22 de febrero, y cálculo de la capacidad de campo.

En la Figura 2 se observa en detalle la zona roja correspondiente a la Figura 1. El día 11 de febrero correspondiente al primer evento de riego en estos días, se detecta el punto de capacidad de campo, es decir el punto en el que la pendiente de drenaje cambia significativamente, con un valor de 71,2 %. En cuanto al segundo evento de riego, correspondiente al día 12 de febrero, se detecta este punto con un valor de 71,8 %.

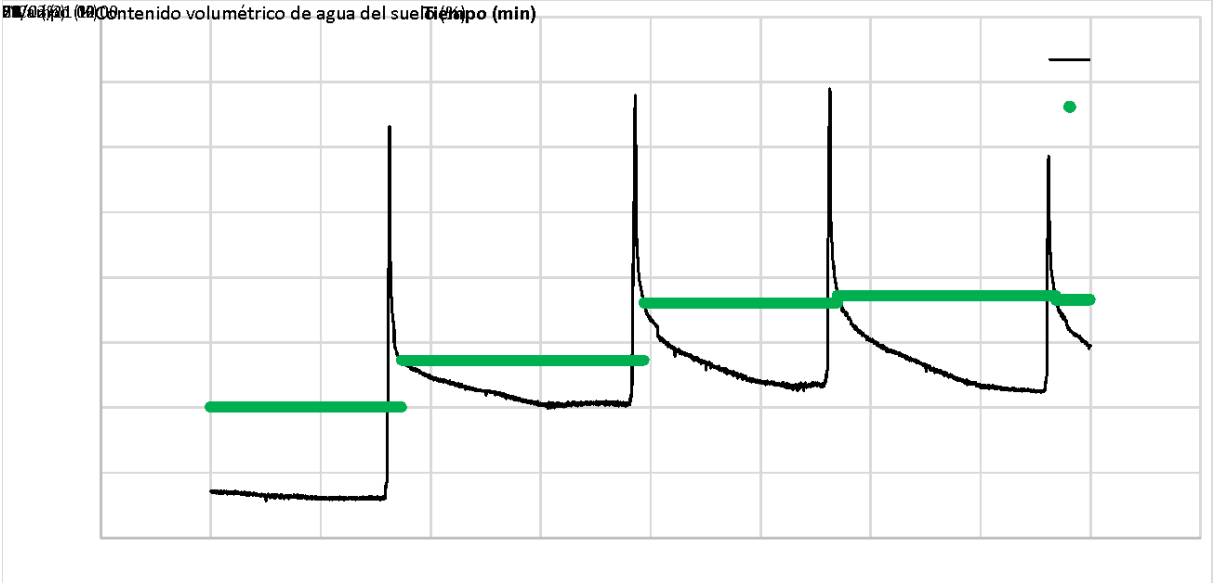


Figura 3. Evolución del contenido volumétrico de agua del suelo entre el 1, 2, 3 y 4 de marzo, y cálculo de la capacidad de campo.

En la Figura 3 se observa en detalle la zona verde correspondiente a la Figura 1. En esta ocasión se señalan unos valores de capacidad de campo de 70,7 %, 71,6 %, 71,7% y 71,6 % para los días 1, 2, 3 y 4 de marzo respectivamente.

Teniendo en cuenta el desarrollo de las pruebas y los resultados obtenidos, en este estudio se ha conseguido un algoritmo que permite detectar automáticamente el punto de capacidad de campo a partir de los datos de un sensor de humedad de suelo, el cual puede ayudar a conseguir una toma de decisiones no pilotada para el manejo del riego.

Conclusiones

Con este estudio se ha obtenido un algoritmo que permite detectar automáticamente el punto de capacidad de campo a partir de los datos de un sensor de humedad de suelo, el cual puede ayudar a conseguir una toma de decisiones no pilotada para el manejo del riego.

La base teórica que se defiende en este trabajo de que, en cuanto un suelo está a capacidad de campo, éste deja de drenar (Pachés Giner, 2019), se puede considerar consistente, aunque cabe ampliar el conocimiento en esta línea de investigación contrastando el funcionamiento del algoritmo en distintas texturas del suelo, ya que la capacidad de campo está influenciada por ésta (FAO).

Por otro lado, ganaría robustez el algoritmo desarrollado contrastando los resultados mediante ensayos de cálculo de laboratorio mediante métodos oficiales de estimación de la capacidad de campo, y que se propone como ampliación de esta línea de investigación.

Agradecimientos

Al Proyecto de Investigación y Desarrollo con referencia IDI-20190146, titulado “Desarrollo e implantación de un equipo de ferticontrol por lisimetría de pesada para uso en agricultura intensiva”, en colaboración con la empresa AGROSOLMEN, S.L., cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Operativo Plurirregional de España 2014-2020.

Referencias

Domínguez-Niño, J. M., Oliver-Manera, J., Girona, J., and Casadesús, J. (2020). Differential irrigation scheduling by an automated algorithm of water balance tuned by capacitance-type soil moisture sensors. *Agricultural Water Management* **228**, 105880.

El-Naggar, A. G., Hedley, C. B., Horne, D., Roudier, P., and Clothier, B. E. (2020). Soil sensing technology improves application of irrigation water. *Agricultural Water Management* **228**, 105901.

FAO Definición Capacidad de campo.

Juan, J. A. d., Tarjuelo, J. M., Valiente, M., and García, P. (1996). Model for optimal cropping patterns within the farm based on crop water production functions and irrigation uniformity I: Development of a decision model. *Agricultural Water Management* **31**, 115-143.

Liao, R., Zhang, S., Zhang, X., Wang, M., Wu, H., and Zhangzhong, L. (2021). Development of smart irrigation systems based on real-time soil moisture data in a greenhouse: Proof of concept. *Agricultural Water Management* **245**, 106632.

Martínez-Gimeno, M. A., Jiménez-Bello, M. A., Lidón, A., Manzano, J., Badal, E., Pérez-Pérez, J. G., Bonet, L., Intrigliolo, D. S., and Esteban, A. (2020). Mandarin irrigation scheduling by means of frequency domain reflectometry soil moisture monitoring. *Agricultural Water Management* **235**, 106151.

Pachés Giner, M. A. (2019). El agua en el suelo. Fuerzas de retención. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.

Soler-Méndez, M., Molina-Martínez, J. M., Ávila Dávila, L., and Ruíz-Peñalver, L. (2019). Sistema de inteligencia artificial para la gestión de la fertirrigación mediante redes de lisimetría de pesada y sensores agronómicos *In* "II Congreso de Jóvenes investigadores en Ciencias Agroalimentarias", Almería (España).

Soler-Méndez, M., Parras-Burgos, D., Mas-Espinosa, E., Ruíz-Canales, A., Intrigliolo, D. S., and Molina-Martínez, J. M. (2021). Standardization of the Dimensions of a Portable Weighing Lysimeter Designed to Be Applied to Vegetable Crops in Mediterranean Climates. *Sustainability* **13**, 2210.

Thompson, R. B., Gallardo, M., Valdez, L. C., and Fernández, M. D. (2007). Using plant water status to define threshold values for irrigation management of vegetable crops using soil moisture sensors. *Agricultural Water Management* **88**, 147-158.

Zinkernagel, J., Maestre-Valero, J. F., Seresti, S. Y., and Intrigliolo, D. S. (2020). New technologies and practical approaches to improve irrigation management of open field vegetable crops. *Agricultural Water Management* **242**, 106404.

Zotarelli, L., Dukes, M. D., and Morgan, K. T. (2013). Interpretación del contenido de la humedad del suelo para determinar capacidad de campo y evitar riego excesivo en suelos arenosos utilizando sensores de humedad: AE496, 1/2013. *EDIS University of Florida. IFAS Extension* **2013**.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Aplicaciones de teledetección para la mejora del riego de granado en la Vega Baja del Segura (Alicante, España)

J. Solano-Jimenez, S. Rodriguez-Cámara, H. Puerto-Molina y J.M. Cámara-Zapata

Grupo de Investigación Agua y Energía para una Agricultura Sostenible, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel, Km. 3,2, Orihuela, Alicante. Joaquin.solano@goumh.umh.es

Resumen

El granado es un cultivo especialmente adaptado a la sequía y a la salinidad, cultivado en áreas en donde en muchos casos es una de las pocas alternativas de cultivo. Aun así, el riego es necesario para satisfacer la demanda del cultivo. Así mismo, la digitalización de la agricultura puede contribuir a la mejora de la eficiencia en la gestión del riego. En este trabajo se emplean herramientas de teledetección para calcular 5 índices de vegetación en dos parcelas de granado, con el objeto de estudiar la correlación entre dichos índices y las necesidades hídricas y dotación hídrica. Para el cálculo de los índices se utiliza una plataforma comercial y software libre (QGIS), en ambos casos con imágenes del satélite Sentinel 2. Los resultados indican una buena correlación entre los valores de los índices de vegetación y las dotaciones de agua de riego al cultivo.

Palabras clave: Agricultura de precisión, SENTINEL-2, QGIS, NDVI, SAVI

Remote sensing applications to improve pomegranate irrigation in Vega Baja del Segura area (Alicante, Spain)

Abstract

The pomegranate is a crop especially adapted to drought and saline soils, and it is grown in areas where, in many cases, it is one of the few agricultural alternatives. Despite its resistance, irrigation is necessary to meet crop demand. In addition, digital technologies can contribute to improving the efficiency of irrigation management. In this work, remote sensing tools are used to calculate 5 vegetation indices in two pomegranate plots, in order to study the correlation between these indices and water needs and water endowment. To calculate these indices, a commercial platform and free software (QGIS) are used, in both cases using images from the Sentinel 2 satellite. The results indicate a good correlation between the values of the vegetation indices and the irrigation water endowments.

Keywords: Precision farming, SENTINEL-2, QGIS, NDVI, SAVI

Introducción

La Vega Baja del Segura es una comarca de la Comunidad Valenciana, España, situada en el extremo sur de la provincia de Alicante, en el límite con la Región de Murcia. La climatología que la caracteriza del tipo BSh en la clasificación del clima de Köppen (AEMET, 2021), y las escasas precipitaciones que recibe (entre 200 - 300 mm anuales), en ocasiones, se ausentan casi por completo, provocando graves sequías como por ejemplo, la que se extendió desde 2014 a 2016 (Biener y Prieto, 2019). Además, a esta escasez hídrica se le añaden temperaturas altas principalmente en verano, así como una alta salinidad en los suelos de la comarca, presentando valores de conductividad eléctrica del extracto de saturación (CEES) superiores a 2.0 dS m^{-1}, lo que supone una pérdida de rendimiento de más del 10 % en el 80 % de la superficie irrigada, aproximadamente (De Paz et al., 2011). En este contexto, el granado (Punica granatum L.) es uno de los frutales más adaptados. Se trata de un frutal que prefiere elevadas temperaturas y humedad ambiental baja para el crecimiento, desarrollándose perfectamente en ambientes áridos y semiáridos, pudiendo soportar sequías periódicas sin daños permanentes (Rodríguez et al., 2012). A pesar de ello, el riego es necesario para satisfacer la demanda del cultivo, siendo el riego por goteo el que mejor permite controlar las necesidades del cultivo.

Por otro lado, el uso de tecnologías digitales podría ayudar en la gestión y manejo de cultivos que se desarrollen en áreas con problemas/déficit en determinados recursos, como es el caso de la comarca de la Vega Baja del Segura y la escasez de agua que presenta. Así, autores como Cavallone et al. (2021) definen agricultura de precisión como la estrategia de gestión enfocada a mejorar la productividad, rentabilidad y sostenibilidad de la producción agrícola a partir de la incorporación de avances tecnológicos principalmente desarrollados para otras industrias. Entre estas tecnologías, la teledetección puede jugar un importante papel como fuente de información complementaria. Los sistemas satelitales de observación de la Tierra, como Sentinel 2, ofrecen imágenes que son ampliamente usadas para evaluar y monitorear el estado de la vegetación, proporcionando información sobre una serie de bandas espectrales que se pueden utilizar para determinar el estado de la vegetación (Ruíz, 2011), mediante operaciones matemáticas. Así mismo, existen numerosas aplicaciones gratuitas, como QGIS, en las que se pueden analizar dichas imágenes satelitales y extraer la información más conveniente.

En una comarca como la Vega Baja del Segura, con una clara escasez de agua y en la que la agricultura posee una gran importancia en la economía, la optimización del riego supone una prioridad, sobre todo con las perspectivas del cambio climático. En este contexto, numerosos estudios han demostrado que la teledetección puede ser muy útil a la hora de monitorear el riego, sobre todo en grandes extensiones de cultivos herbáceos, como cereales, pero apenas es utilizada en el caso de pequeñas parcelas que contienen cultivos leñosos, como es el caso del granado en la Vega Baja del Segura. De este modo, con el propósito de estudiar la viabilidad técnica de esta tecnología en este tipo de plantaciones, en este trabajo se determinan 5 conocidos índices de vegetación y se correlacionan con las necesidades de riego y con la distribución de agua aportada mediante regadío en varias parcelas de granado. Los valores de los índices calculados se obtuvieron utilizando una plataforma comercial privada y además, mediante aplicaciones gratuitas como QGIS, utilizando las imágenes hiperespectrales del satélite SENTINEL 2. Los resultados muestran la adecuación de las herramientas de bajo coste para la optimización del riego en este tipo de cultivos. Sin embargo, la información proporcionada por las técnicas de teledetección ha de complementarse con información obtenida a pie de campo sobre la gestión del cultivo para la mejora de la gestión del riego. Por ello, es preciso continuar este tipo de estudios para contribuir a la mejora de la sostenibilidad de la producción agrícola mediante la aplicación de técnicas de digitalización.

Material y Métodos

Los índices de vegetación se calcularon sobre dos parcelas regadas mediante riego localizado, situadas ambas en la comarca de la Vega Baja del Segura, una en el municipio de Albatera y la otra en el de San Isidro y separadas aproximadamente 3 km entre sí. La parcela situada en Albatera posee una superficie de 18.450 m2 y contiene una plantación adulta de granados, variedad Mollar de Elche, con un marco de plantación de 4,5 x 3,0 m2. La parcela de San Isidro tiene aproximadamente 3,0 has y está plantada de granados adultos del cultivar Mollar de Elche con un marco de plantación de 5,0 x 3,0 m2. En esta segunda parcela se realizó la poda de los árboles a principio de mayo y la retirada de los restos de la poda y de las malas hierbas a mediados de dicho mes. Se realizaron sendas entrevistas personales con ambos productores para determinar los indicadores más característicos de la gestión del cultivo y del riego. En el siguiente mapa (figura 1) se puede apreciar la cercanía de ambas parcelas, separadas por la autovía del mediterráneo.



Figura 1. Mapa de situación.

Los valores de evapotranspiración de referencia (Howell y Evett, 2004) y las necesidades de cultivo (Intrigliolo et al., 2011a) se determinaron a partir de los datos climáticos registrados en la estación meteorológica más cercana que formaba parte de la Agencia Nacional de Meteorología de España: la estación climática de Catral.

En lo que a la determinación de los valores de los índices de vegetación se refiere, estos se determinaron utilizando dos herramientas diferentes. Por un lado, se hizo uso de una plataforma comercial online previa subscripción. Se trata de un software online que ofrece la posibilidad de incorporar una serie de herramientas de agricultura de precisión para una superficie determinada, entre las que se incluye los índices de vegetación. Para ello se debe introducir el archivo *shapefile* con la parcela a estudiar en la plataforma. Esta plataforma utiliza las imágenes de SENTINEL 2, un satélite del programa Copernicus, que ofrece imágenes hiperespectrales con una frecuencia de 5 días y un tamaño de píxel de 10 x 10 m2. Las imágenes correspondientes a días con un porcentaje de nubes superior al 15% son descartadas de manera automática. Al seleccionar la parcela, el software descarga la imagen que corresponde a la zona y día de interés y realiza las operaciones matemáticas correspondientes para calcular los índices de vegetación. El resultado proporcionado por la plataforma es el valor promedio del índice en toda la parcela. Por otro lado, los valores de los índices también se determinaron utilizando el software gratuito QGIS y las imágenes hiperespectrales del satélite SENTINEL 2. Para calcular los valores de los índices, se utilizó la calculadora ráster QGIS, aplicando

la expresión de cada índice a las bandas correspondientes. A diferencia de la plataforma online, cuando se hacía uso del programa QGIS se determinaron los valores máximos y mínimos diarios de la parcela a lo largo del año, y a partir de ellos, se obtuvo el valor medio. De manera similar al caso anterior, se descartaron las imágenes de satélite nubladas.

En cuanto a los índices empleados, son los siguientes:

- NDVI (Normalized Difference Vegetation Index): Propuesto por Rouse et al. (1974), es el índice más ampliamente utilizado en teledetección. Considera la cantidad de energía roja (R) que es absorbida por la clorofila y la cantidad de energía del infrarrojo cercano (NIR) que se refleja en la estructura celular de la hoja (Rubio *et al*., 2020). Se utiliza para medir la cobertura vegetal presente en cada píxel de la imagen. Su expresión es la siguiente (ecuación 1):

$$NDVI = (NIR - R) / (NIR + R) \quad (1)$$

- NDRE (Normalized Difference Red Edge): Consiste en uno de los índices más utilizados, junto con el NDVI (Lacastagneratte *et al*., 2021). Según Boiarskii y Hasegawa (2019), el NDRE revela cultivos con bajo contenido de clorofila, lo que indica una limitación en el nitrógeno foliar. Se utilizan la energía en el infrarrojo cercano (NIR) y la energía en el borde rojo (RE). Su expresión es la siguiente (ecuación 2):

$$NDRE = (NIR - RE) / (NIR + RE) \quad (2)$$

- SAVI (Soil Adjusted Vegetation Index): Es una variación del NDVI que considera la influencia del suelo y minimiza sus efectos a través de un parámetro, L, que es función de la densidad de la vegetación y toma el valor de 0.5 para densidades intermedias (Huete, 1988). Este índice es muy útil cuando se utiliza en terrenos con un alto porcentaje de suelo desnudo. Su expresión es la siguiente (ecuación 3):

$$SAVI = (NIR - R)(1 + L) / (NIR + R + L) \quad (3)$$

- RECl (Red Edge Chlorophyll Index): El RECl es un índice relacionado con la actividad fotosintética de la cubierta vegetal, debido a su sensibilidad al contenido de clorofila en las hojas. Dado que el nivel de clorofila está directamente relacionado con el nivel de nitrógeno en el cultivo, este índice permite identificar las áreas del campo con este tipo de deficiencia. Su expresión es la siguiente (ecuación 4):

$$RECI = (NIR / RE) - 1 \quad (4)$$

- NDMI (Normalized Difference Moisture Index): Este índice muestra el nivel de estrés hídrico presente en el cultivo. Sus valores varían de -1 a 1. En su cálculo se utiliza la variable SWIR, que se refiere a la banda de infrarrojos de onda corta. La expresión es la siguiente (ecuación 5):

$$NDMI = (NIR - SWIR) / (NIR + SWIR) \quad (5)$$

Resultados y Discusión

Los valores medios mensuales (año 2020) de temperatura, humedad relativa (en ambos casos, máxima, media y mínima), radiación solar, velocidad del viento y precipitación registrados se muestran en la figura 2. En lo referente a temperatura, éstas llegaron a los 40 ºC, superando los 30 ºC todos los días durante los meses de julio y agosto. Por otro lado, las mínimas alcanzaron valores inferiores a 0 ºC, aunque al ocurrir en pleno reposo invernal (diciembre y enero), no afecta al cultivo. La amplitud térmica fue de 10 ºC o más en aproximadamente el 85% de los días y la radiación solar superó los 25 MJ m^{-2} durante los meses de mayo a agosto, ambos incluidos. La zona no experimentó fuertes vientos y la precipitación en 2020 fue levemente superior al valor promedio de la zona, con un valor acumulado total de 320 mm.

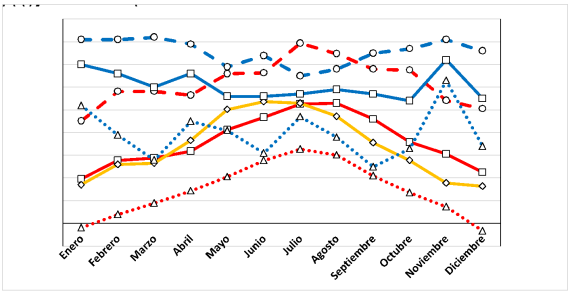


Figura 2. Valores climáticos mensuales. Radiación solar (naranja), temperatura (azul), y humedad relativa (rojo). Para estas dos últimas se indican valores medios (línea continua), máximos (línea discontinua) y mínimos (línea a puntos).

La evolución anual de la evapotranspiración de cultivo se muestra en la figura 3, y supuso un total de 6.870 m^3 ha^{-1}. Su tendencia es muy similar a la de la temperatura ambiente, con valores máximos superiores a 6 mm en junio y julio (datos no mostrados). La distribución temporal del riego se correlaciona con la evolución de las necesidades de riego (R^2 = 0,78 y R^2 = 0,90, en las parcelas de Albatera y San Isidro, respectivamente). En el caso de Albatera, la dotación de riego supera las necesidades en primavera y otoño, y es insuficiente en verano. La dotación fue de 250 m^3 ha^{-1} en marzo y noviembre, 510 m^3 ha^{-1} para abril y octubre, 630 m^3 ha^{-1} para mayo y septiembre y 760 m^3 ha^{-1} para junio, julio y agosto, lo que representa aproximadamente un consumo anual de 5.060 m^3 ha^{-1}, es decir, el 75% de las necesidades anuales del cultivo. En el caso de la parcela de San Isidro, la tendencia es similar, aunque se aproxima más a las necesidades hídricas, satisfaciendo el 80% de éstas. La dotación fue de 100 m^3 ha^{-1} en febrero, 200 m^3 ha^{-1} en marzo, 400 m^3 ha^{-1} en abril, 600 m^3 ha^{-1} en mayo, 1.100 m^3 ha^{-1} en junio y julio, 1.000 m^3 ha^{-1} en agosto, 500 m^3 ha^{-1} en septiembre y 250 m^3 ha^{-1} en octubre.

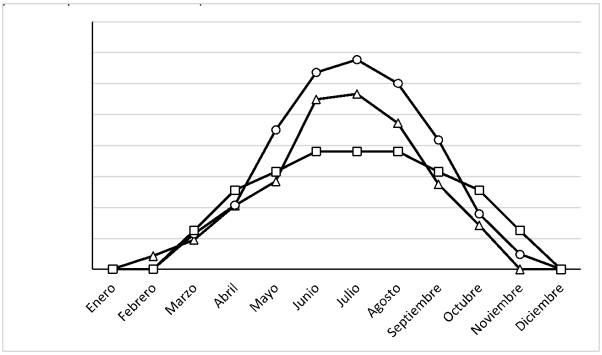


Figura 3. Valores diarios de las necesidades de riego (círculos) y del aporte de agua en la parcela de Albatera (cuadrados) y de San Isidro (triángulos).

En lo que respecta a los índices de vegetación, a continuación (tabla 1) se presentan los valores medios para ambas parcelas. La parcela de Albatera presenta los mayores valores.

Tabla 1. Valores medios anuales de los índices de vegetación.

Índice de Vegetación	Parcela Albatera	Parcela San Isidro
NDVI	0,49	0,35
NDRE	0,29	0,22
SAVI	0,64	0,51
RECl	2,38	1,22
NDMI	0,07	-0,03

El análisis de la evolución de los valores del NDVI (Figura 4a) indica que los granados inician su crecimiento al inicio de la primavera, coincidiendo con suministros de agua de riego superiores a las necesidades del cultivo. Los valores del índice aumentan aproximadamente a partir del 10 de marzo, permanecen constantes durante la primavera y el verano, y disminuyen a partir del 17 de octubre. Su valor promedio durante el intervalo vegetativo es de 0,56. Las tendencias para el resto de los índices de vegetación son muy similares. El valor medio durante la fase de evolución aproximadamente constante es 0,33 para el NDRE, 0,71 para el SAVI, 2,98 para el RECI y 0,13 para el NDMI. En la parcela de San Isidro, las evoluciones de los valores de los índices difieren notablemente de las anteriores, como consecuencia de la poda y su eliminación junto con las malas hierbas, manteniéndose estables entre el 1 de junio y el 31 de octubre. En este intervalo, los valores medios son 0,35 para el NDVI, 0,22 para el NDRE, 0,52 para el SAVI, 1,10 para el RECI y -0,03 para el NDMI.

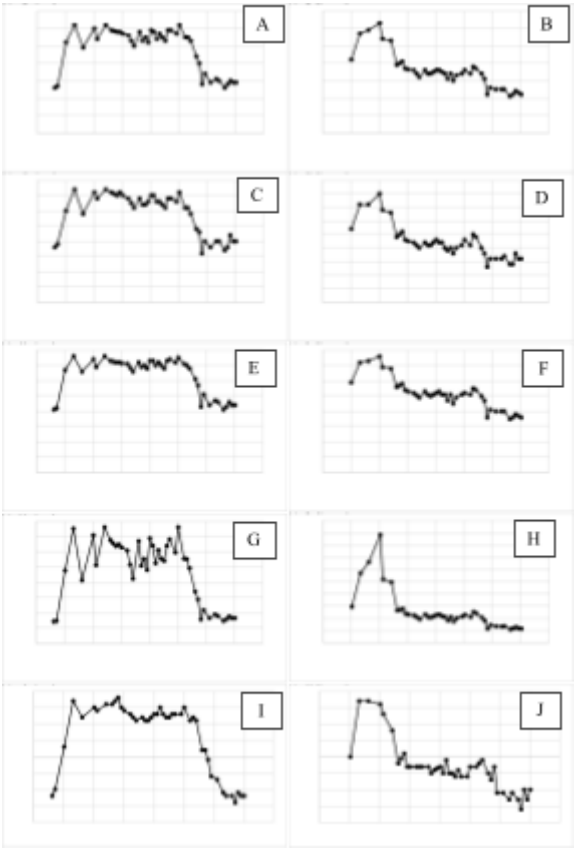


Figura 4. Evoluciones de los índices de vegetación (NDVI, NDRE, SAVI, RECI y NDMI) durante el ciclo de cultivo de 2020 en parcelas de granado en Albatera (a, c, e, g, i) y en San Isidro (b, d, f, h, j).

Por otro lado, los índices de vegetación también se calcularon utilizando el software gratuito QGIS. En este caso, los valores que se obtienen son los máximos y los mínimos de cada parcela. En general, se ha encontrado una correlación lineal altamente significativa (valores p <0,001) entre los valores proporcionados por la plataforma comercial y los valores medios obtenidos de QGIS. La Tabla 2 muestra los resultados de emplear correlaciones lineales entre los valores de dichos parámetros.

En cuanto a las posibles aplicaciones en la programación de riegos, los valores de los índices de vegetación muestran una correlación lineal significativa con los correspondientes a la dotación de riego. Sin embargo, apenas presentan correlación con las necesidades de riego del cultivo. La Tabla 3 muestra el coeficiente de determinación entre los valores de los índices de vegetación proporcionados por la plataforma comercial y QGIS y las necesidades mensuales de suministro de agua y riego. Únicamente se indican los valores correspondientes a la parcela de Albatera. Los valores de estos coeficientes de determinación tienden a aumentar cuando se utilizan los valores de los índices obtenidos mediante la aplicación QGIS. Así, por ejemplo, el coeficiente de determinación entre los valores NDVI obtenidos por QGIS y el suministro de agua fue de 0,85, y 0,64 cuando se trabaja con necesidades de riego (frente a 0,69 y 0,42 obtenidos con los valores proporcionados por la plataforma comercial).

Tabla 2. Correlaciones entre los valores de los índices de vegetación aportados por la plataforma comercial y los calculados a partir de QGIS en ambas parcelas.

Índice de Vegetación	Parcela Albatera	Parcela San Isidro
NDVI	y = 1,30 x + 0,09; R^2 = 0,96	y = 1,25 x + 0,01; R^2 = 0,91
NDRE	y = 1,94 x – 0,25; R^2 = 0,92	y = 1,49 x – 0,12; R^2 = 0,94
SAVI	y = 1,04 x + 0,16; R^2 = 0,97	y = 1,02 x + 0,10; R^2 = 0,87
RECl	y = 0,55 x – 0,01; R^2 = 0,83	y = 0,42 x + 0,62; R^2 = 0,69
NDMI	y = 1,30 x + 0,09; R^2 = 0,88	y = 0,67 x + 0,13; R^2 = 0,36

Tabla 3. Coeficientes de determinación de los valores de los índices de vegetación frente a la dotación de riego y las necesidades de riego del cultivo en la parcela de Albatera.

	Dotación de riego		Necesidades de riego	
	R^2 (plataforma comercial)	R^2 (QGIS)	R^2 (plataforma comercial)	R^2 (QGIS)
NDVI	0.69	0.85	0.42	0.64
NDRE	0.67	0.72	0.49	0.74
SAVI	0.72	0.82	0.42	0.59
RECI	0.62	0.75	0.43	0.82
NDMI	0.77	0.73	0.49	0.75

Discusión

En la Vega Baja del río Segura, las áreas de producción de granado se corresponden con los suelos más salinos como consecuencia de su resistencia a este tipo de estrés abiótico (Intrigliolo et al., 2011b). Las áreas cultivables del municipio de Albatera presentan valores medios de la CE del extracto de saturación entre 0 y 50 cm que van desde 2,0 a 4,0 dS m-1, mientras que en San Isidro, los valores oscilan entre 4 y 6 dS m-1 (De Paz et al., 2011). En ambos casos, el agua de riego proviene del trasvase Tajo-Segura, con una CE que oscila alrededor de 1,0 dS m-1, lo que la hace muy adecuada para el riego de frutales (Intrigliolo et al., 2013). Teniendo en cuenta el elevado precio de adquisición del agua (en torno a 0,12 euros m-3) y que el granado es un cultivo resistente a la sequía, el sistema de riego común en la zona es ligeramente deficitario, con dotaciones anuales que representan el 75 y del 80% de las necesidades hídricas en Albatera y San Isidro, respectivamente.

La distribución del riego a lo largo del año varía considerablemente entre las parcelas analizadas. Así, en Albatera, la dotación de agua en los meses de verano es claramente menor a las necesidades del cultivo (aproximadamente un 60%), mientras que es ligeramente superior en los meses de otoño. Sin embargo, en la parcela de San Isidro las distribuciones del aporte de agua de riego y de las necesidades del cultivo son similares. Estas diferentes formas de gestionar el riego se pueden explicar atendiendo a las diferentes características edafológicas de ambas áreas de cultivo. Así, la mayor salinidad del suelo en San Isidro obliga a incrementar la dotación de riego en los meses más cálidos para evitar un excesivo efecto de la salinidad sobre el cultivo. Por su parte, en la parcela de Albatera se puede mantener el riego ligeramente elevado en otoño para asegurar la producción del cultivo.

El valor medio del NDVI a lo largo del ciclo de cultivo varía entre las dos parcelas analizadas como con-secuencia de las diferentes características de las parcelas y de la diferente gestión del cultivo. A pesar de que los valores de los índices de vegetación son similares a principio de año, los correspondientes a la parcela de San Isidro se reducen de forma drástica a principio de mayo, coincidiendo con la poda de los árboles, y a mitad de dicho mes, coincidiendo con la eliminación de los restos de poda y de las malas hierbas en la parcela. En general, los valores encontrados son bajos cuando se compara con los encontrados en otros estudios con el mismo cultivo (Niu et al., 2020) (Tabla 1), probablemente debido a la salinidad del suelo de las parcelas, sobre todo la de San Isidro, y a la deficitaria dotación de agua.

Al igual que el NDVI, el NDRE es sensible a la biomasa y a la estructura de la parte aérea del cultivo, y se correlaciona con el nivel de nitrógeno foliar (Tsouros et al., 2019). El valor medio encontrado es inferior al valor del NDVI, de manera similar a otros estudios con cultivos comparables (García, 2019). El valor del SAVI supera levemente al del NDVI, ya que reduce el efecto de la fracción de suelo no cubierta por el cultivo. Por su parte, el valor medio de RECI es alto, lo que indica un nivel adecuado de nitrógeno en el cultivo. Por último, el valor medio del NDMI prácticamente nulo podría indicar un contenido de agua deficiente, como consecuencia de que el suministro anual de riego es inferior a las necesidades del cultivo. Los valores medios de los índices de vegetación correspondientes a la parcela de San Isidro experimentan una reducción respecto de los de la parcela de Albatera del 30%, para el NDVI, el NDRE y el SAVI, el 60% para el RECI, aproximadamente, y mayor incluso para el NDMI.

La estimación de la evapotranspiración del cultivo es importante para la mejora de la gestión del riego. Tradicionalmente, su determinación se realiza a partir de la evapotranspiración de referencia y el coeficiente de cultivo. Los valores del NDVI pueden contribuir a mejorar la resolución en el espacio y el tiempo. Hay estudios, en los que los valores del NDVI muestran una significativa correlación con los del coeficiente de cultivo (Niu et al., 2020). Otros autores encuentran una elevada correlación entre los valores del NDVI y los de la evapotranspiración de referencia (Zhao, 2019). En este trabajo no se

han encontrado correlaciones significativas entre los valores de dichos parámetros. Sin embargo, se han encontrado correlaciones significativas con la distribución de las dotaciones de riego en la parcela de Albatera.

Conclusiones

Los resultados indican una correlación lineal significativa entre los índices de vegetación y la distribución del agua de riego a lo largo del ciclo de cultivo anual. Sin embargo, estos indicadores no se correlacionan con las necesidades hídricas del cultivo. La correlación significativa tiende a mejorar cuando los valores del índice se calculan utilizando QGIS, el cual es un software gratuito.

La determinación de la evolución de los valores de los índices de vegetación, junto con la información edafoclimática, de riego y de gestión del cultivo, determinadas en campo, pueden ayudar con el modelado del cultivo y la simulación de su evolución con el objetivo de predecir su comportamiento al cambiar las condiciones de cultivo. Es necesario seguir realizando este tipo de determinaciones para contribuir a la optimización del riego del granado, mejorando así la sostenibilidad del cultivo y la resiliencia de los productores frente al cambio climático.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado dentro del proyecto Datos para el Riego de la Vega Baja y Bajo Vinalopó, VBDat, y ha sido financiado por la Convocatoria 2020 de ayudas a la investigación de la Universidad Miguel Hernández.

Bibliografía

Biener, S., y Prieto, A., 2019. Inundaciones de septiembre de 2019 en la Vega Baja del Segura: causas y consecuencias. Revista del instituto alicantino de cultura Juan Gil-Albert. 70, 31-45.

Boiarskii, B., & Hasegawa, H., 2019. Comparison of NDVI and NDRE indices to detect differences in vegetation and chlorophyll content. Journal of Mechanics of Continua and Mathematical Sciences. 4, 20.

Cavallone, P., Botta, A., Carbonari, L., Visconte, C., & Quaglia, G., 2021. The agri.q mobile robot: Preliminary experimental tests. 94, 524-532. doi:10.1007/978-3-030-55807-9_59

De Paz, J. M., Visconti, F., & Rubio, J. L., 2011. Spatial evaluation of soil salinity using the WET sensor in the irrigated area of the Segura River lowland. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 174(1), 103-112. doi:10.1002/jpln.200900221

Howell, T.A., Evett, S.R., 2004. The Penman-Monteith method. Section 3 in Evapotranspiration: Determination of Consumptive Use in Water Rights Proceedings. Continuing Legal Education in Colorado, Inc. Denver, CO.

Huete, A. R. y Warrick, A. W., 1990. Assessment of vegetation and soil water regimes in partial canopies with optical remotely sensed data. Remote Sensing of Environment. 32, 155-167.

Intrigliolo, D. S., Nicolás, E., Bonet, L., Ferrer, P., Alarcón, J. J., & Bartual, J., 2011a. Water relations of field grown Pomegranate trees (Punica granatum) under different drip irrigation regimes. Agricultural Water Management. 98(4), 691-696.

Intrigliolo, D.S., Puerto, H., Bonet, L., Alarcon, J.J., Nicolas, E., Bartual, J., 2011b. Usefulness of trunk diameter variations as continuous water stress indicators of pomegranate (Punica granatum), trees. Agricultural Water Management. 98(9), 1462-1468.

Intrigliolo, D.S., Bonet, L., Nortes, P.A., Puerto, H., Nicolas, E. et al., 2013. Pomegranate trees performance under sustained and regulated deficit irrigation. Irrigation Science. 31(5), 959–970. doi: 10.1007/s00271-012-0372-y.

Lacastagneratte, D. D., Rocha, F. S., Fernandes, M. F. G., Muniz, M. F. S., Catão, H. C. R. M., Albuquerque, C. J. B., 2021. Detection of fusariosis on black pepper plants using multispectral sensor. Journal of Plant Diseases and Protection. 128(2), 571-576. doi:10.1007/s41348-020-00409-8

Niu, H., Wang, D., & Chen, Y., 2020. Estimating actual crop evapotranspiration using deep stochastic configuration networks model and UAV-based crop coefficients in a pomegranate orchard. Autonomous Air and Ground Sensing Systems for Agricultural Optimization and Phenotyping V. 11414.

Rodríguez, P., Mellisho, C. D., Conejero, W., Cruz, Z. N., Ortuño, M. F., et al., 2012. Plant water relations of leaves of pomegranate trees under different irrigation conditions. Environmental and Experimental Botany. 77, 19-24. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.08.018

Rouse, J. W., Haas, R. H., Schell, J. A., Deering, D. W., & Harlan, J. C., 1974. Monitoring the vernal advancement and retrogradation (green wave effect) of natural vegetation. NASA/GSFC Type III Final Report, 371

Rubio, A. P., López, D. H., Altamirano, H. L., & González, E. Z., 2020. Teledetección en la agricultura de precisión: estado del arte de los índices de vegetación. TECTZAPIC. 6, 46-58.

Ruíz, A. Comportamiento y análisis de Descriptores de texturas en imágenes Modis (Trabajo final de máster), 2011. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Zhao, J.; Chen, X.; Zhang, J.; Zhao, H.; Song, Y., 2019. Higher temporal evapotranspiration estimation with improved SEBS model from geostationary meteorological satellite data. Scientific Reports. 9, 14981.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Determinación de la variación de la huella hídrica y la huella de carbono en una comunidad de regantes como medida de la mejora medioambiental de las instalaciones. Aplicación a un caso de estudio.

F. López Peñalver, J. Chazarra Zapata, A. Melián Navarro, A. Ruiz Canales

Programa ReTos AAA – Centro de Investigación e innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO). – Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel Km 3.2. – 03312 Orihuela. Email: franpenyalver@gmail.com

Resumen

Se expone un caso de estudio de una comunidad de regantes. Se cuantifican las generaciones y disminuciones de CO_2 y la huella de carbono asociada a la huella hídrica antes y después de incluir unas medidas de ahorro. Se tuvieron en cuenta los datos de las facturas de electricidad, junto con el consumo total de energía por origen. Adicionalmente se determinaron los datos financieros. Junto a ello, se ha determinado el volumen total de agua que se ha movido dentro del sistema y se distinguen las huellas hídricas azul, verde y gris. Se determina posteriormente la relación entre la huella de carbono generada por la huella hídrica necesaria, obteniendo una relación kWh·m-3 (IE-W). Estos valores cambian periódicamente mediante telecontrol. Como pauta de manejo de la red se utiliza el valor medio de las tres proporciones según el origen y se divide, por el agua total comprada. Entre los resultados se obtuvo el valor final (IE-W) 0,62 kWh·m-3. Considerando que el volumen de agua reducido por la huella hídrica fue de 731.014,41 m3, se obtuvieron unas reducciones de las emisiones de CO2eq (0,382 kgCO2eq·kWh-1), equivalente a 139 t de CO2eq/a. Cabe señalar que, para este estudio, sólo se han considerado las emisiones asociadas con el consumo de energía y la manipulación de agua para el riego. En realidad, este valor es superior porque la reducción del agua en la huella hídrica está asociada con un menor consumo de fertilizantes. Ello aumentaría este valor en aproximadamente un tercio.

Palabras clave: *huella hídrica, huella de carbono, riego, consumo de energía, sostenibilidad*

Determination of the variation of the water footprint and the carbon footprint in a water users association as a measure of the environmental improvement of the facilities. Application to a case study.

Abstract

A case study of a water users association is exposed. Generations and reductions of CO2 and the carbon footprint associated with the water footprint are quantified before and after including some saving measures. Data from electricity bills were taken into account, along with total energy consumption by origin. Additionally, the financial data were determined. Along with this, the total volume of water that has moved within the system has been determined and the blue, green and gray water footprints are distinguished. The relationship between the carbon footprint generated by the necessary water footprint is subsequently determined, obtaining a kWh · m-3 (IE-W) ratio. These values change periodically by remote control. As a guideline for managing the network, the average value of the three proportions according to origin is used and divided by the total water purchased. Among the results, the final value (IE-W) 0.62 kWh · m-3 was obtained. Considering that the volume of water reduced by the water footprint was 731,014.41 m3, reductions in CO2eq emissions were obtained (0.382 kgCO2eq · kWh-1), equivalent to 139 t of CO2eq / a. It should be noted that, for this study, only emissions associated with energy consumption and water handling for irrigation have been considered. In reality, this value is higher because the reduction of water in the water footprint is associated with a lower consumption of fertilizers. This would increase this value by approximately one third.

Keywords: water footprint, carbon footprint, irrigation, energy consumption, sustainability

Introducción

El binomio agua-energía tiene una importancia fundamental para las explotaciones agrícolas con sistemas hídricos presurizados en las zonas del área mediterránea. Estas zonas templadas del área mediterránea están sometidas a estrés hídrico durante ciertos períodos anuales, cada vez más prolongados. La disminución de aportaciones de agua debido al cambio climático está obligando a los agricultores del levante español a desarrollar sistemas sostenibles agua-energía que permitan hacer viables sus explotaciones.

Para conseguir explotaciones sostenibles desde el punto de vista medioambiental es preciso reducir la huella hídrica, así como la huella de carbono asociada al consumo energético que precisan.

Con este fin se ha de promover, por un lado, la reducción del consumo hídrico de las explotaciones junto con el aporte adicional de recursos hídricos de diversas procedencias (aprovechando las aportaciones de lluvias torrenciales mediante captación por tanques de tormenta y tanques ambientales, aprovechamiento de aguas regeneradas, entre otros). Ello permite mejorar la eficiencia de los sistemas de distribución hídrica.

Por otro lado, se debe promover la mejora de la gobernanza. Una herramienta que permite esta mejora es la gestión de los recursos mediante TIC´s en tiempo real. Ello se complementará con el uso de energías alternativas y tendría como fin la reducción de costes y de producción de CO_2.

Simultáneamente, todas estas tecnologías tienen como objetivo la reducción de la huella de carbono asociada a la huella hídrica.

Este estudio se basa en una auditoría energética utilizados en el este de España (Camacho *et al.*, 2017; Melián *et al.*, 2017). Se ha establecido un esquema que puede ser aplicable a otros sistemas de agua, que analiza las emisiones generadas, tanto evitables como no evitables. En una primera fase, el sistema total de unidades de agua (sistema de riego) y debe evaluarse el consumo de componentes energéticos localizados (Daccache *et al.*, 2014), considerando tanto la reducción de agua como la huella de carbono.

Para lograr un resultado global, la facturación energética ha sido estudiado en los últimos años junto con el consumo de agua por sectores existentes.

Respecto al consumo hídrico, este estudio examinó cómo sectorizar la comunidad de regantes agrupando sectores por niveles de altura manométrica similares, porque el exceso de presión puede provocar fugas en los puntos de riego (Jackson *et al.*, 2010).

Además, se estudian diferentes escenarios que son capaces de abastecer de agua según demanda por combinando varias fuentes (es decir, pozos, trasvases, agua regenerada), sin comprometer la viabilidad.

También es necesario localizar cualquier fuga para repararla o determinar el funcionamiento anormal de los elementos hidráulicos, complementando esto con el uso de agua regenerada (Jiménez, 1981; Grigoriev *et al.*, 2011; Picket *et al.*, 2020). Estos procesos se logran mediante un balance energético donde las tomas de agua y CO_2.

Una vez completados estos pasos, es necesario estudiar las partes del sistema que consumen energía y generan emisiones (Rothausen y Conway, 2011).

Posteriormente se analiza el consumo de energía y se analiza si se sustituyen por energías renovables (Schilardi, 2019) o se reduce su consumo mediante la aplicación de medidas y sistemas inteligentes.

Se ha calculado también el equivalente de CO_2 secuestrado por la comunidad de regantes.

Material y Métodos

Este estudio analizó el consumo mensual de todos los puntos de consumo en los usuarios del agua en una comunidad de regantes durante los últimos 10 años (alrededor de 216.360 registros). Estos datos

se procesaron en Excel para determinar la facturación de energía para el año 2016 (considerado como año de referencia).

Además, se tuvieron en cuenta todas las entradas y el consumo de agua durante 2016 para determinar un valor real de kWh de la energía asociado a cada m^3 de agua consumida.

Con los kWh / m^3 obtenidos anualmente, se determinaron los valores de CO_2 eq t asociados al consumo de energía, para determinar la huella de carbono generada por la comunidad de regantes.

Posteriormente con este valor de kWh / m^3, y después de aplicar reducciones por medidas de gobernanza y consumo, es posible calcular cuánta energía se está desperdiciando. Además, se calculan las emisiones de CO_2 eq evitadas.

Posteriormente, para mostrar los beneficios del manejo de cultivos en la reducción de la huella de carbono, se realizó un estudio sobre la evolución de los cultivos a lo largo de 10 años en los dos términos municipales asociados a esta comunidad de regantes.

A partir de los estudios del CEDEX (Centro de Estudios y Experimentación y Obras Públicas en España) sobre equivalentes de CO_2 secuestrado por estos cultivos, según su especie, se determinó el equivalente de CO_2 secuestrado. (Sadegh *et al.*, 2020).

La comunidad de regantes de la zona en estudio está ubicada en la Región de Murcia. El área de regadío es de 799,71 ha: SECTOR I “HUERTA ALTA” (373,58 ha) y SECTOR II “HUERTA BAJA” (426,03 ha). Esta comunidad de regantes es una combinación de diferentes grupos y asociaciones de riego con más de 1400 agricultores. Se nutre de tres fuentes de agua (agua regenerada de la planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR) de una localidad cercana, agua del Trasvase Tajo-Segura (TST) y pozo en la propiedad). Los costos asociados son proporcionales a la energía necesaria para bombear el agua y transportarla a las parcelas que lo requieran.

Las obras de gobernanza y planificación del agua juegan un papel fundamental en el logro de los objetivos del análisis del ciclo de vida a largo plazo (LCA). En este caso, las acciones en la agricultura no son instantáneas; requieren un plazo medio para ser eficaces y lograr objetivos importantes.

El uso de energía está asociado a una huella de carbono que deben reducirse para alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) y reducir el impacto en el medio ambiente.

Es importante considerar las características agroclimáticas clave de esta comunidad de regantes en relación con el estudio: clima subtropical mediterráneo cálido o semicálido, con altas temperaturas durante el verano determinado por su latitud, alcanzando valores de 32-34 C, precipitaciones escasas (200-300 mm anuales), aunque intenso en años de inundaciones (p. ej., pueden producirse lluvias torrenciales que superen los 350 mm). Por estas razones por las que la capacidad de abastecimiento de agua debe estar garantizada durante los meses más secos, en los años de mayor precipitación.

Para determinar las necesidades hídricas de la comunidad de regantes, se analizaron los regímenes operativos de las diferentes fuentes disponibles y se utilizó un año de referencia, que era el más adecuado al consumo medio durante los últimos 10 años. Estos datos proporcionaron una instantánea de las necesidades por mes. Como estas necesidades son estacionales (es decir, el suministro varía con los meses del año, dependiendo del clima y el estado de almacenamiento de la cuenca cedente del Tajo), se requiere la coordinación de los embalses que se encuentran en servicio y los diferentes recursos disponibles. La cantidad anual de agua disponible es de 3.629.361 m^3, lo que garantiza la supervivencia de los cultivos. Usando estos valores como punto de partida, es importante analizar y proponer acciones para comparar y cuantificar las potenciales mejoras asociadas. Se debe establecer un escenario inicial, con datos específicos que luego puedan ser evaluados. Se consideró 2016 como año de referencia.

Si se analiza la cantidad de kWh consumidos para el suministro de agua de riego, la cantidad total de 2016 fue de 2.032.471 kWh. Para calcular la huella de carbono generada es importante conocer la tasa

de transformación de este valor. Los valores de horquilla de los estudios investigados oscilan entre 0,0413 kg CO_2eq / kWh (Cardozo *et al.*, 2016), hasta 0,947 kgCO_2eq / kWh (Cheng *et al.*, 2012), debido al mix de generación utilizado en cada área de estudio. Esta ha sido una clave factor en el cálculo de las emisiones de GEI derivadas de la gestión del agua en el riego y, en consecuencia, es importante profundizar en este aspecto, analizando y considerando variaciones en la tasa de transformación de electricidad, para calcular con mayor precisión las emisiones de GEI generadas.

En total, se dedujeron 74 gCO_2eq / kWh del costo de las emisiones involucradas en la generación e instalación de placas fotovoltaicas según datos obtenidos de la tabla 8 del estudio de Nugent *et al.*, 2014. El resultado son los 0,08 kgCO_2eq / kWh de este estudio que se ajusta a los valores establecidos anteriormente (teniendo en cuenta cuenta la relación: 1 kWh corresponde a 0.308 kg de CO2 eq) equivalía a una cantidad total de 626 t CO_2 eq (Figura 1).

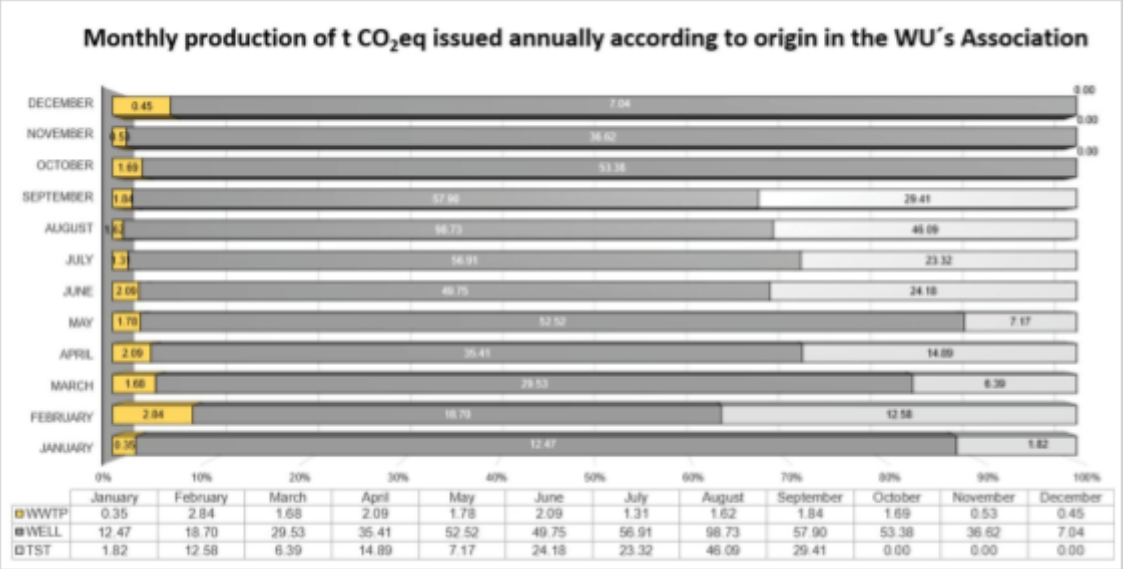


Figura 1. % de la tasa de t del caudal de CO_2 equivalente emitido a la atmósfera en 2016. Fuente, elaboración propia.

Después de analizar el sistema, las decisiones enmarcadas deben aplicarse en el ámbito de la gobernanza del agua, con el fin de eliminar las limitaciones del sistema y mejorar su explotación aprovechando los recursos disponibles y considerando los puntos débiles. Estos podrían referirse a embalses donde la explotación no contribuye significativamente al sistema y conduce a la pérdida de agua por evaporación.

Para aprovechar la superficie, se podrían introducir plantas fotovoltaicas (u otras plantas viables) en generar energías limpias.

Se tienen en cuenta los objetivos de la propuesta de ley europea sobre el clima del Parlamento Europeo, respaldados por el objetivo de la UE, de lograr emisiones netas de gases de efecto invernadero para 2050 en su Resolución de 14 de marzo de 2019 sobre el cambio climático 4 (Comisión Europea, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Es necesario actuar sobre las fuentes de consumo de energía de la comunidad de regantes. Después se analizan las facturas relevantes. Los puntos de mayor consumo son los sistemas de bombeo de captación y en este caso hay tres (Figura 2).

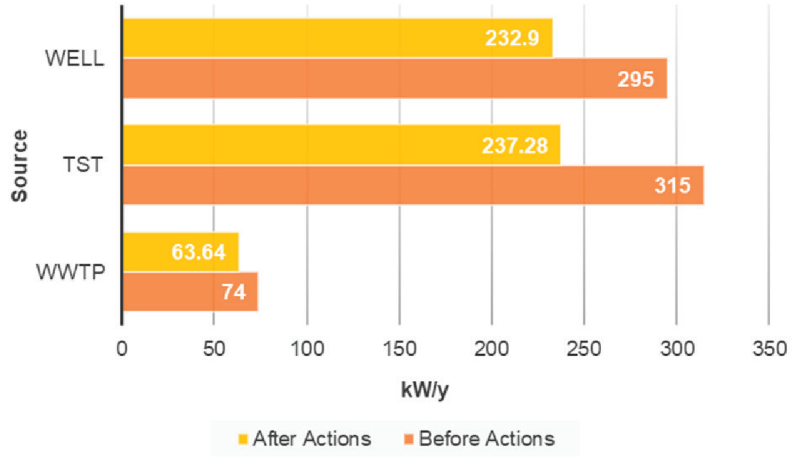


Figura 2. Consumo anual por fuente ((kW)). Fuente: Elaboración propia.

El primer objetivo hacia la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero fue mejorar la eficiencia de elevar el agua. Por este motivo, se realizó un estudio del estado de funcionamiento de las bombas, comparando esto con los requisitos óptimos del equipo para su uso en condiciones reales. Esto reveló que todas las bombas tenían que ser reemplazadas y se requerían variadores de frecuencia (Tabla 1). El segundo objetivo era reemplazar el uso de energía convencional con energía renovable. Esto permite la reducción de consumo, junto con las emisiones asociadas.

Después de un análisis detallado de las diferentes tecnologías disponibles, la generación fotovoltaica fue identificada como la opción óptima. Esto se debió a la madurez de la tecnología, la disponibilidad de áreas, la irradiación elevada en el área y la proximidad entre las zonas de generación y consumo.

Para calcular la energía generada en cada uno de los sistemas fotovoltaicos, se empleó la base de datos del Satélite Application Facility on Climate Monitoring (CM SAF), perteneciente a la Organización Europea para la Explotación de Satélites Meteorológicos, y como herramienta de cálculo se utilizó el PVGIS (Sistema de información geográfica fotovoltaica) (Suri *et al.*, 2007; Rosas-Flores *et al.*, 2019) y PVWatts (Huld *et al.*, 2019; Arab *et al.*, 2020) que proporcionaron la radiación solar potencial. Este software utiliza todos los valores climáticos (irradiación, temperatura, entre otros) y valores geográficos de la zona.

Esto permite obtener la energía generada por cada una de las plantas fotovoltaicas. Para diseñar el sistema, la separación entre filas y módulos y la inclinación óptima de los paneles se consideraron en función de la latitud. El sistema está diseñado para utilizar depósitos de acumulación para necesidades instantáneas, evitando así el uso de baterías que deben ser renovadas y finalmente generando una huella de carbono durante la producción y posterior eliminación. El bombeo se alimentará desde el campo fotovoltaico y se programan los inversores de acuerdo con los niveles en los depósitos existentes y el nivel de producción requerido. Mediante el software PVGIS de la base de datos CM SAF, se obtuvo la producción eléctrica diaria y anual suministrada por cada una de las plantas calculadas (Chazarra *et al.*, 2020; Psiloglou, 2020).

Es importante tener en cuenta que los periodos mensuales de funcionamiento de la bomba deben adaptarse a la curva de generación mensual de una instalación fotovoltaica, redistribuyendo el consumo pico en los meses consecutivos y aprovechando la existencia de embalses para la regulación y la cuota que funciona como sistemas para la acumulación de energía potencial, así como la instalación de baterías de condensadores. Ello equivale a un ahorro significativo para aumentar la eficiencia de las instalaciones solares. (Figura 3).



Figura 3. Embalses e Instalaciones Solares. Fuente: Elaboración propia.

Una vez calculadas las acciones del componente eléctrico del sistema, se debe estudiar la huella hídrica, analizando los balances del agua comprada para riego y el costo real de los mismos para los agricultores (Figura 4). La diferencia es igual a las pérdidas en el sistema y cumple la huella hídrica, dividida de la siguiente manera: las pérdidas debidas a la evaporación durante el almacenamiento en los embalses y las pérdidas por el estado de la red hidráulica.

Después de evaluar estas pérdidas, se pueden tomar varias acciones para reducir la huella hídrica. Primero, el sistema se analiza, con base en los principios de gobernanza eficiente del agua (ver área azul del diagrama, Figura 4). Para ello, se debe informar a los agricultores sobre los cultivos permitidos, así como dotaciones máximas por parcela, y los turnos establecidos que están vinculados a las alturas manométricas de las parcelas en ambos sectores. Para que esto sea viable, es necesario utilizar las TIC que nos brindan información en tiempo real. Ello posibilita el cambio de los programas de riego en función de los datos proporcionados por las estaciones meteorológicas, o ajuste de agua suministrada a la parcela.

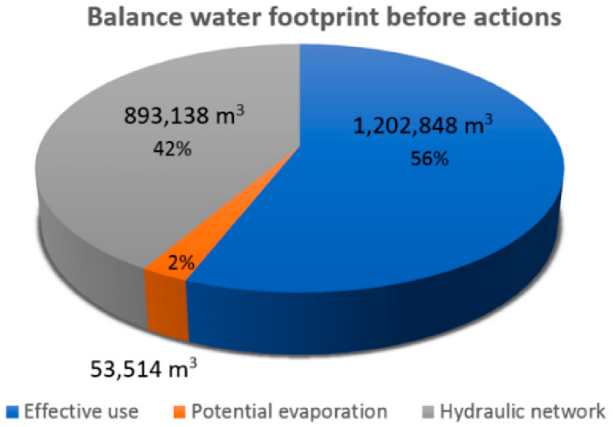


Figura 4. Equilibrio de la huella hídrica antes de las acciones. Fuente: elaboración propia.

También es posible programar el riego para que se detenga si se delimitan determinados valores de humedad en el terreno. Todas estas actuaciones suponen un ahorro en el consumo directo de agua (que, en nuestro caso, equivalía aproximadamente entre el cinco y el 10% del agua consumida real). Este ahorro es cuantificado al no desperdiciar agua que no beneficia al cultivo. A su vez, esto conduce a una pérdida de energía asociada con el agua, que requiere energía del sistema para extraer, distribuir y usar el agua en una parcela, aunque con la mínima presión, para que los sistemas de riego localizado. Además, es importante evaluar y cuantificar el efecto sobre la huella de carbono. La eficiencia en la aplicación representa el agua que utilizan los cultivos, comparada a la aplicada a la trama. Esto dependerá del sistema de riego utilizado y las pérdidas ocasionadas por percolación profunda y falta de uniformidad. Esta evaluación se llevó a cabo para el conjunto comunidad de regantes, estableciendo el promedio ponderado, basado en la distribución proporcional de los sistemas de riego utilizados por superficie. Estos valores fueron obtenidos a partir de las eficiencias en las áreas de regadío consideradas en la ORDEN ARM / 2656/2008, de 10 de septiembre.

La red actual cuenta con un sistema de riego superficial con cobertura total (riego general) desde las dotaciones de las acequias. Esto proporciona un valor de eficiencia en la aplicación del 60% o, en algunos En los casos con riego por goteo en superficie y buen manejo la eficiencia se establece en el 90%. Esto significa que la reducción por consumo indirecto asciende a, al menos, el 35% del agua realmente consumida (1.020.848,10 m^3).

La reducción de la huella hídrica por pérdidas por consumo directo se ha diferenciado en dos secciones: a) ICR por potencial de evaporación: pérdidas por evaporación en la superficie de los estanques durante el almacenamiento (Estos representan las pérdidas asociadas con el aislamiento recibido por las superficies de la lámina de agua de estanques y cuyo valor se ha estimado en 0,5 m^3 / m^2) (Molina-martínez et al., 2006). Para estimar esto, las pérdidas iniciales deben evaluarse primero con las balsas disponibles antes de aplicar el reductor. Después de aplicar estas acciones, se calculan las nuevas superficies expuestas. Las balsas han sido cubiertos con una lámina de polipropileno TPO reforzada con malla de poliéster en el interior, que se estima que se reducirá en un 95%. Con la diferencia en volumen de agua evaporada WeBA = 53,514 m^3 antes y después de las acciones correctivas WeAA = 27,492 m^3, la huella hídrica generada ha sido cuantificado, obteniendo un valor de WeR = 26.022 m^3. Ello representa el volumen de agua ahorrada anualmente al cubrir balsas y la reducción de la superficie expuesta a la insolación, eliminando dos de las balsas y transformándolas en plantas fotovoltaicas.

b) ICR para mejoras de agua: la nueva mejora introducida en el sistema como la duplicación de los conductos ha permitido un aprovechamiento más adecuado y la distribución en conductos abiertos se ha eliminado frente a tuberías presurizadas, mientras que se han instalado válvulas con sistemas de control remoto con solenoide. Los solenoides y contadores en el cabezal de riego permiten un equilibrio de entradas y salidas de agua, lo que ayuda a aclarar qué sectores y redes sufren pérdidas de agua y requieren reparación. Este tipo de mejora reduce el volumen total de pérdidas (Vls = 946.651,90 m^3) en aproximadamente un 30%, lo que a su vez reduce la huella hídrica para las mejoras hídricas del sistema (VlsR = 283.995,57 m3). Finalmente, el valor de la reducción de la huella hídrica se basa en la reducción por consumo directo (por gobernanza y TIC) y consumo indirecto (por evaporación y por acciones hidráulicas) (Figura 5), lo que equivale a una cantidad total de 731.014,41 m^3, desagregado según el resumen que se muestra en la Tabla 5.



Figura 5. Lámina impermeable en el depósito para reducir la evaporación. Fuente: elaboración propia.

Resultados y Discusión

Reducción de la huella de carbono por huella hídrica

En este estudio, utilizando datos de facturas eléctricas, se ha calculado el consumo total de energía por origen calculado. Gracias a estos datos financieros, el volumen total de agua que se ha movido dentro del sistema también se ha determinado. Esto aclara la huella de carbono que genera la huella hídrica requerida para obtener una relación kWh / m^3 (IE-W). Este cociente cambiará anualmente y, si hay un

seguimiento adecuado de los movimientos del agua cuando está en funcionamiento, la escala de telecontrol se puede determinar con mayor precisión y valor. En este estudio se utiliza el valor promedio de las tres razones según origen y dividido por el total de agua comprada. El valor final obtenido fue (IE-W) 0,62 kWh / m^3. Si se considera que el volumen de agua reducido por huella hídrica es de 731.014,41 m3, se obtiene una reducción de emisiones de CO_2 eq (0.382 kgCO_2eq / kWh), equivalente a 139 t CO_2eq (Figura 6).

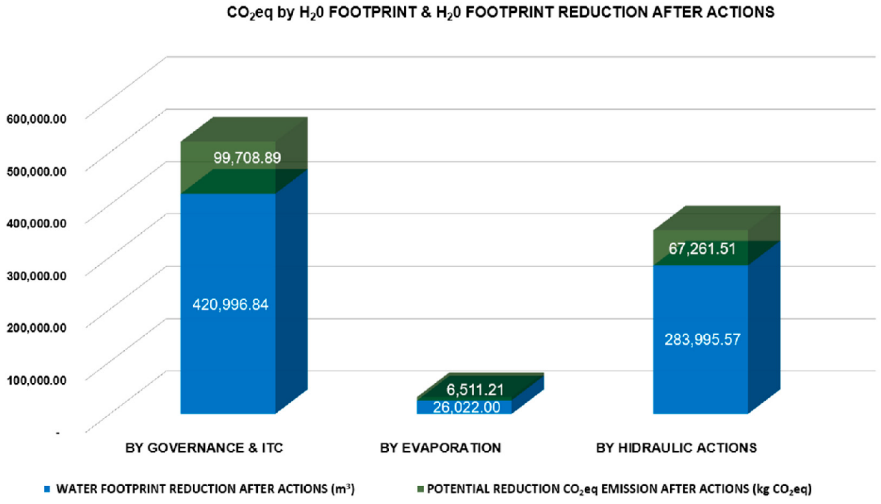


Figura 6. Reducción de CO_2 eq por huella hídrica tras acciones. Fuente: elaboración propia.

Cabe señalar que para nuestro estudio se han considerado solo las emisiones asociadas con el consumo de energía, el manejo del agua para riego, en realidad es superior porque la reducción la huella hídrica está asociada con un menor consumo de fertilizantes que aumentaría este valor en aproximadamente un tercio.

Secuestro de carbono. Dado que el propósito de una comunidad de regantes es la producción de alimentos basada en cultivos en crecimiento, se determinará la cantidad de CO_2 eq secuestrado por esta comunidad de agricultores. En consecuencia, este trabajo se basa en el estudio de la tipología de los cultivos y variedades de riego existentes en la zona, así como su evolución en los últimos 10 años. En base a estos datos, la distribución de unidades de cultivo por área que difiere de la planta, se ha estimado la totalidad de la tierra de cultivo y los valores anuales de carbono secuestrado de acuerdo con el estudio de Carvajal *et al*., 2014. Estos valores han descontado el CO_2 eq generado durante la existencia de la planta. La mitad del día se dedica a depurar CO_2 eq por día, transformándolo en carbono, emitiendo aproximadamente un tercio de CO_2 eq por la noche (Zermeño *et al.*, 2012). Como se muestra, la reducción anual de CO_2 eq para cultivos (Tabla 6) de una comunidad de regantes es alta, con 7007 t CO_2 eq secuestrados de la atmósfera.

El equilibrio total de nuestro sistema agua-energía nos proporciona muchos beneficios, como se muestra en la Figura 7.

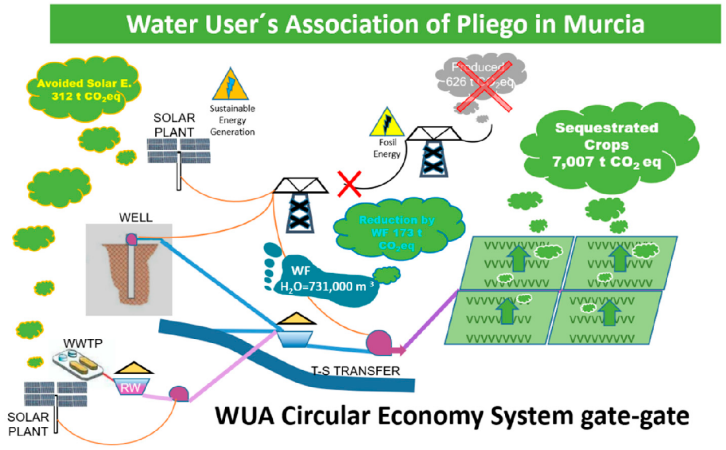


Figura 7. Resumen de los efectos ambientales generados en la comunidad de regantes.

Hay que tener en cuenta que hay ahorros en las emisiones anuales de CO_2 eq después de la implementación de estas tres instalaciones fotovoltaicas, según se indica: 111,18 t CO_2 eq para el bombeo del agua de trasvase, 167,31 t CO_2 eq para pozo de bombeo, 33,46 t CO_2 eq para bombeo de la EDAR.

Estas tres acciones mejoran significativamente la capacidad energética de la comunidad de regantes, ya que, reducirán los costos anuales de mantenimiento una vez que se haya alcanzado el punto de equilibrio para la instalación, además de estar totalmente desconectado del factor de tarifa eléctrica.

Además, es importante destacar la reducción de la huella hídrica (731.014,41 m^3) que contribuye a la reducción de emisiones de CO_2 eq en 173 t por año. Sin embargo, clave es la posibilidad de ser un sumidero de CO_2 eq que reduce, en este caso, hasta 7492,08 t CO_2 eq por año que es una magnífica contribución al medio ambiente (Figura 8).

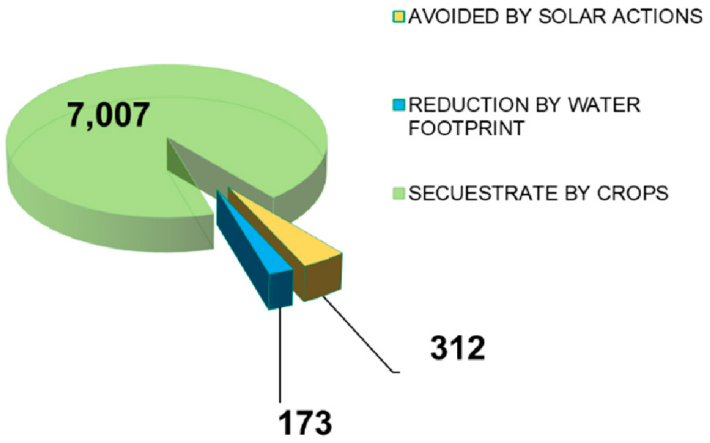


Figura 8. Resumen nueva reducción futura t CO2eq / año después de acciones.

Conclusiones

La relación del binomio agua-energía en sistemas hídricos, nos ayudan a optimizar ambos sistemas dentro del marco los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas, en especial del eje prosperidad. Objetivos 7, 8, 9, 10, 11 y 13.

La agricultura que mantiene los bosques de frutales y plantaciones de hortalizas nos permite a la par alimentarnos y respirar un aire más puro (ODS -11). Es replicable a países en vías de desarrollo y les permita mejorar en comunidad (ODS-10), reduciendo la desigualdad entre los países.

Las asignaciones de dotaciones para cultivos y las TICs que promueven la innovación de dispositivos (ODS-9), para mejorar la gestión del agua en la agricultura. Adicionalmente, están mostrando su potencial y futuro recorrido de incluir a las mujeres como gestoras de explotaciones agrícolas tecnificadas (ODS-10)

Cabe señalar que, en las zonas semiáridas del Mediterráneo, no sólo debemos considerar las explotaciones agrícolas como el principal medio de producción, sino también debemos tener en cuenta, que esta investigación orienta a las regiones agrícolas a construir y diseñar infraestructuras de riego que sean resilientes (ODS-8), así como un método ecológico de protección contra el cambio climático y en particular contra la desertificación ODS-13.

Este estudio también busca colaborar para cumplir los objetivos de la política europea dentro del Marco de Clima y Energía para 2030:

• Reducción de al menos un 40% de las emisiones de gases de efecto invernadero (en relación con los niveles de 1990).

• Aumentar al menos un 32% de la participación de las energías renovables.

• Mejorar la eficiencia energética en al menos un 32.5%.

Al mismo tiempo, contribuimos al cumplimiento de los ODS-7 Objetivos de energía limpia y asequible, ODS-13 acción climática.).

Bibliografía

Camacho, E.; Rodríguez, J.; Montesinos, P., 2017. Ahorro de agua y consumo de energía en la modernización de regadíos. En: Efectos de la modernización de regadíos en España, 221-249. Ed. Cajamar: Almería.

Daccache, A.; Ciurana, J.; Diaz, J.R.; Knox, J.W., 2014. Water and energy footprint of irrigated agriculture in the Mediterranean region. Environ. Res. Lett., 9, 124014. https://doi.org/ https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/12/124014.

Melián-Navarro, A.; Molina-Martínez, J.; Rodríguez-Díaz, J.; Ruiz-Canales, A., 2017. Performance indicators to assess the implementation of automation in golf courses located in Southeast Spain. Agric. Water Manag., 183, 35–40. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.11.017.

Jackson, T.M.; Khan, S.; Hafeez, M. A., 2010. Comparative analysis of water application and energy consumption at the irrigated field level. Agric. Water Manag. 97, 1477–1485. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.04.013.

Jiménez Beltrán, D., 1981. Nuevas tendencias en la depuración y aprovechamiento de aguas residuales (CyTET). Ciudad y territorio: Revista de ciencia urbana, 2, 49-58.

Grigoriev, A.; Sinyak, Y.E.; Samsonov, N.; Bobe, L.; Protasov, N.; Andreychuk, P., 2011. Regeneration of water at space stations. Acta Astronaut., 68, https://doi.org/1567–1573. 10.1016/j.actaastro.2010.05.018.

Pickett, M.T.; Roberson, L.B.; Calabria, J.L.; Bullard, T.J.; Turner, G.; Yeh, D.H., 2020. Regenerative water purification for space applications: Needs, challenges, and technologies towards 'closing the loop'. Life Sci. Space Res., 24, 64–82. https://doi.org/10.1016/j.lssr.2019.10.002.

Rothausen, S.G.; Conway, D., 2011. Greenhouse-gas emissions from energy use in the water sector. Nat. Clim. Chang. 2011, 1, 210–219. https://doi.org/10.1038/NCLIMATE1147.

Schilardi, C., 2019. Diseño de un sistema de bombeo solar fotovoltaico para riego por goteo en viñedos. Actas del II Congreso de Agua, Ambiente y Energía, Montevideo, Argentina, 25–27 Septiembre.

Sadegh, M.; AghaKouchak, A.; Mallakpour, I.; Huning, L.S.; Mazdiyasni, O.; Niknejad, M.; Foufoula-Georgiou, E.; Moore, F.C.; Brouwer, J.; Farid, A., 2020. Data and analysis toolbox for modeling the nexus of food, energy, and water. Sustain. Cities Soc. 2020, 61, 102281. https://doi.org/10.1016/j.scs.2020.102281.

Chazarra-Zapata, J.; Molina-Martínez, J.M.; Cruz, F.-J.P.D.L.; Parras-Burgos, D.; Ruíz Canales, A., 2020. How to Reduce the Carbon Footprint of an Irrigation Community in the South-East of Spain by Use of Solar Energy.

Energies 2020, 13, 2848. https://doi.org/10.3390/en13112848.

Cardozo, N.P.; de Oliveira Bordonal, R.; La Scala, N., Jr., 2016. Greenhouse gas emission estimate in sugarcane irrigation in Brazil: Is it possible to reduce it, and still increase crop yield? J. Clean. Prod., 112, 3988–3997. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.040.

Cheng, L.; Yue,W.; QIU, G.-Y., 2013. Water and energy consumption by agriculture in the Minqin Oasis Region. J. Integr. Agric., 12, 1330–1340. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60542-0.

Nugent, D.; Sovacool, B.K., 2014. Assessing the lifecycle greenhouse gas emissions from solar PV and wind energy: A critical meta-survey. Energy Policy, 65, 229–244. https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.10.048.

Comisión Europea, 2018. Regulation of the European Parliament and of the Council Establishing the Framework for Achieving Climate Neutrality and Amending Regulation (EU) 2018/1999 (European Climate Law). https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52020PC0080 (acceso en 2 septiembre 2020).

Zhang, D.D.; Pei, Q.; Lee, H.F.; Jim, C.Y.; Li, G.; Zhang, M.; Li, J.; Wu, Z.; Wang, L.; Yue, R.P., 2020. Climate change fostered cultural dynamics of human resilience in Europe in the past 2500 years. Sci. Total Environ., 744, 140842. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140842.

Šúri, M.; Huld, T.A.; Dunlop, E.D.; Ossenbrink, H.A., 2007. Potential of solar electricity generation in the European Union member states and candidate countries. Sol. Energy, 81, 1295–1305. https://doi.org/10.1016/j.solener.2006.12.007.

Rosas-Flores, J.A.; Zenón-Olvera, E.; Morillón Gálvez, D.M., 2019. Potential energy saving in urban and rural households of Mexico with solar photovoltaic systems using geographical information system. Renew. Sustain. Energy Rev., 116, 109412. https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109412.

Huld, T.; Müller, R.; Gambardella, A., 2012. A new solar radiation database for estimating PV performance in Europe and Africa. Sol. Energy 2012, 86, 1803–1815. https://doi.org/10.1016/j.solener.2012.03.006.

Arab, A.H.; Taghezouit, B.; Abdeladim, K.; Semaoui, S.; Razagui, A.; Gherbi, A.; Boulahchiche, S.; Mahammed, I.H., 2020. Maximum power output performance modeling of solar photovoltaic modules. Energy Rep., 6, 680–686. https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.09.049.

Psiloglou, B.; Kambezidis, H.; Kaskaoutis, D.; Karagiannis, D.; Polo, J., 2020. Comparison betweenMRMsimulations, CAMS and PVGIS databases with measured solar radiation components at the Methoni station, Greece. Renew. Energy, 146, 1372–1391. https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.064.

Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la instrucción de planificación hidrológica. (B.O.E. No. 229, de 22 de septiembre, 2008). https://www.boe.es/eli/es/o/2008/09/10/arm2656 (accessed on 2 September 2020).

Molina-Martínez, J.M.; Martínez-Álvarez, V.; Baille, A.; González-Real, M.M., 2006. Estimación de la evaporación en embalses de riego mediante un modelo de balance de energía. Ing. Agua, 13, 219–230. https://doi.org/10.4995/ia.2006.2892.

Carvajal, M.; Mota, C.; Alcaraz-López, C.; Iglesias, M.; Martínez-Ballesta, M., 2014. Investigación sobre la absorción de CO_2 por los cultivos más representativos. Departmento, V.N., Ed.; CEBAS-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC): Murcia.

Zermeño-González, A.; Villatoro-Moteno, S.; Cortés-Bracho, J.J.; Cadena-Zapata, M.; Catalán-Valencia, E.A.; García-Delgado, M.Á.; Munguía-López, J.P., 2012. Estimación del intercambio neto de CO2 en un cultivo de caña de azúcar durante el ciclo de plantilla. Agrociencia, 46, 579–591.

Sesión 9:

Usos del Territorio. Valoración de Recursos Agrarios. Desarrollo Rural.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Diversidad social y agroambiental en los paisajes mediterráneos costeros: el ENP La Muela y Cabo Tiñoso (Cartagena – Murcia)

J. Martínez Sánchez [1] y L. Martínez-Carrasco Martínez [2]

[1] Departamento de Didáctica de las Ciencias Experimentales, Facultad de Educación, Universidad de Murcia, Calle Campus Universitario, 12, 30100, Murcia; e-mail: j.martinezsanchez@um.es
[2] Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel km 3, 2, 03312, Orihuela, Alicante; e-mail: lmartinez@umh.es

Resumen

Los ambientes mediterráneos costeros se han caracterizado por una histórica intervención humana que ha permitido desarrollar paisajes rurales de gran diversidad agroambiental, intervenidos por un gran número de componentes socioeconómicos. El objetivo principal de la investigación es identificar los recursos geoclimáticos, bióticos y socioculturales del paisaje agroforestal del Espacio Natural "La Muela, Cabo Tiñoso y Roldán", situado en la parte occidental del litoral de Cartagena, al Sur de la Región de Murcia. El estudio se basa en una profunda revisión bibliográfica apoyada en el estudio cuantitativo de datos socioterritoriales, siguiendo una perspectiva desde la ecología del paisaje En este territorio de más de 11.000 ha, se reconoce un mosaico agroforestal donde los cultivos de secano de almendro se alternan con masas de matorral y bosque mediterráneo, bajo las condiciones de intensa aridez y escasez de agua que caracterizan su abrupta topografía. Aparece asociado un alto grado de biodiversidad faunística y florística que justifica su protección como Red Natura 2000 y Espacio Natural Protegido (ENP). Un creciente número de nuevos residentes, muchos de ellos extranjeros, vienen a compensar el envejecimiento y masculinización de la población originaria. Los entornos rurales, repletos de pequeños núcleos rurales y viviendas diseminadas, cuentan con valiosos recursos histórico-patrimoniales y etnológicos pero con limitados servicios ecoturísticos y alejados servicios sociales.

Palabras clave: paisaje, rural, Espacio Natural Protegido, Red Natura 2000

Diversity of social and environmental resources of the mediterranean landscapes: Muela-Cabo Tiñoso-Roldan Natural Area (Cartagena-Spain)

Abstract

The Muela-Cabo Tiñoso-Roldán Natural Area is a rural-coast area with more than 11.000 hectares, located near to the city of Cartagena, in the southeast of Spain. The increasing social interest in this kind of agronatural landscapes and the wide diversity of its components, show the relevance of a detailed study from the interdisciplinary perspective of landscape ecology. The analysis sets up to describe the whole natural and sociocultural resources using fieldwork and a deep local-bibliographical review supporting the quantitative study of territorial data. A historical human intervention of the coastal Mediterranean ecosystems has developed rural landscapes plenty of agro-environmental diversity, intervened by a wide variety of socioeconomic components. That steep and dry territory raise an agroforestry mosaic of almond fields mixed with scrub vegetation and Mediterranean forest. That area has different legal protection forms due to the special animal and plant biodiversity of the landscape. A growing number of new residents, many of them foreigners, are compensating the high levels of aging and masculinization of the original population. The urbanized areas are distributed in small rural centers and scattered housing, keeping valuable historical-patrimonial and ethnological resources but with insufficient ecotourism infrastructure and remote public services providing.

Keywords: landscape, rural, Protected Natural Area, Natura Network 2000

Introducción

El paisaje ha tenido un gran reconocimiento en los últimos años como recurso ambiental, social y económico, favorecido por su defensa social y su puesta en valor (Gómez Moreno, 2008). Su definición aparece asociada a un territorio determinado y en un momento concreto bajo la combinación de elementos naturales (físicos, químicos y biológicos) y/o humanos (económicos, sociales y culturales), mostrada en (Vila I Subirós *et al.,* 2006). Es la dinámica y continua evolución de estos componentes los que proporcionan a los paisajes su carácter histórico, que muestra la cultura del territorio y propicia la creación de una identidad territorial social y política, ligada a un espacio geográfico, convirtiéndose en expresión de la identidad única propia de un lugar (Antrop, 2006). Su fisionomía particular, resultado de la incidencia singular de una serie de factores naturales y sociales, la que aportan la excepcionalidad a cada paisaje (Mata Olmo, 2008).

La interpretación del paisaje tiene una dimensión poliédrica, que de manera general abarca numerosos ámbitos de estudio (Silva Pérez, 2009), dificultando enormemente su estudio. Para simplificar el concepto se ha recurrido habitualmente a concretar y clasificar sus características, formaciones y usos principales (García del Barrio *et al.,* 2003; Santos y Ganges, 2003). Sin embargo, la manifiesta complejidad que albergan los paisajes agroforestales justifica la necesidad de abarcar el más amplio abanico de elementos conformadores de paisaje (Antrop, 2005), adoptando una visión integral y multidisciplinar. En este sentido, la ciencia de la ecología del paisaje ofrece esta perspectiva transdisciplinar integradora de información de las ciencias sociales (sociología, economía, geografía, demografía, antropología, etnología…) y naturales (ecología, agronomía, biología, botánica, zoología…) (Tello Aragay, 1999). La aplicación de técnicas de ecología del paisaje ha sido diversa, demostrando gran potencial para planificaciones del uso de suelo más realistas (Hawkins *et al.,* 2002).

En este sentido, se plantea el presente trabajo que persigue el objetivo principal de identificar de manera amplia los principales recursos naturales y socioculturales que interactúan en un paisaje agroforestal como el del Espacio Natural “La Muela, Cabo Tiñoso y Roldán”. Su definición sirve de base para el estudio de los procesos que definen el paisaje a través del reconocimiento de las interacciones entre sus componentes (Martínez-Sánchez y Martínez-Carrasco, 2019).

Material y Métodos

La investigación comienza con una profunda revisión bibliográfica de documentación (teóricos, prácticos, manuales, normativa…) referente a los recursos del paisaje del Espacio Natural de La Mueal y Cabo Tiñoso, y la Comarca de Cartagena en la que se integra territorialmente. Posteriormente, se recogen datos estadísticos para la identificación de los recursos sociodemográficos. Se utilizan también diversas fuentes cartográficas bajo la utilización de Sistemas de Información Geográfica (SIG), con el objeto de complementar algunos de los indicadores geopoblacionales a través del análisis y la representación territorial. La información se complementa y confirma con técnicas de investigación cualitativa en trabajo de reconocimiento del terreno y con la realización de 15 entrevistas semiestructuradas (duración entre 20-70 minutos), 8 reuniones con agentes locales (pedáneos, residentes, Empresarios, etc.) y 7 entrevistas gestores públicos del territorio (Técnicos regionales y municipales, Agentes Medioambientales, etc.); durante los años 2013-2016.

Los datos proceden principalmente de las siguientes fuentes secundarias: (1) Datos sociodemográficos y socioeconómicos procedentes del Instituto Nacional de Estadística (INE), Centro Regional de Estadística de Murcia (CREM) y Servicio Municipal de Estadística de Cartagena (SMEC); (2) Datos cartográficos procedentes de Geoportal, CARTOMUR, PNOA, IGN; tratados y presentados con la herramienta ESRI-ARCGIS®; (3) Información sobre servicios educativos y sanitarios, obtenida a partir de las webs EDUCARM y Murciasalud, respectivamente; (4) Información sobre tejido

asociativo, procedente de los Registros de Asociaciones de la Región de Murcia y el Ayuntamiento de Cartagena; (5) Información ambiental y sobre patrimonio histórico y etnológico procedente de bibliografía diversa y de las webs murcianatural y patrimur, respectivamente.

El ámbito de estudio del presente trabajo es el paisaje de "La Muela, Cabo Tiñoso y Roldán", que abarca una superficie de 11.361,04 ha. al sureste de España, ocupando la zona centro más meridional de la Región de Murcia, fundamentalmente en el Término Municipal de Cartagena. La zona alberga varias figuras de protección ambiental, tanto en su medio terrestre como marino, entre las que destaca la catalogación como Espacio Natural Protegido (ENP) y la pertenencia a la Red Natura 2000 (Lugar de Importancia Comunitaria - LIC y Zona de Especial Protección para las Aves - ZEPA) (Figura 1).

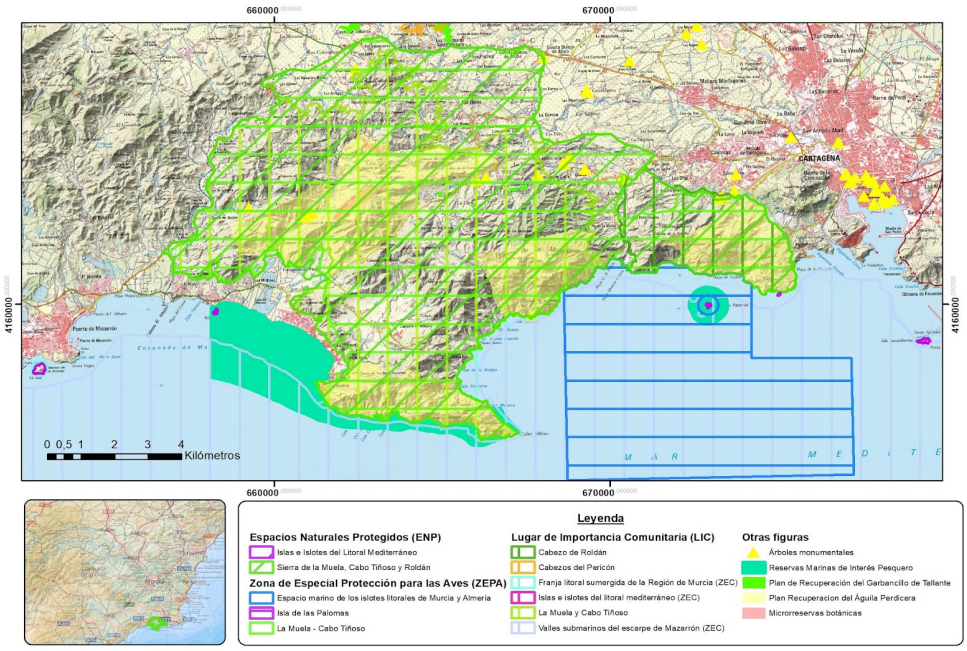


Figura 1. Delimitación de las distintas figuras de ordenación y protección territorial.

Resultados y Discusión

La amplia diversidad de recursos presentes en el paisaje mediterráneo costero del Espacio Natural La Muela y Cabo Tiñoso se organiza para su catalogación del siguiente modo (Figura 2):

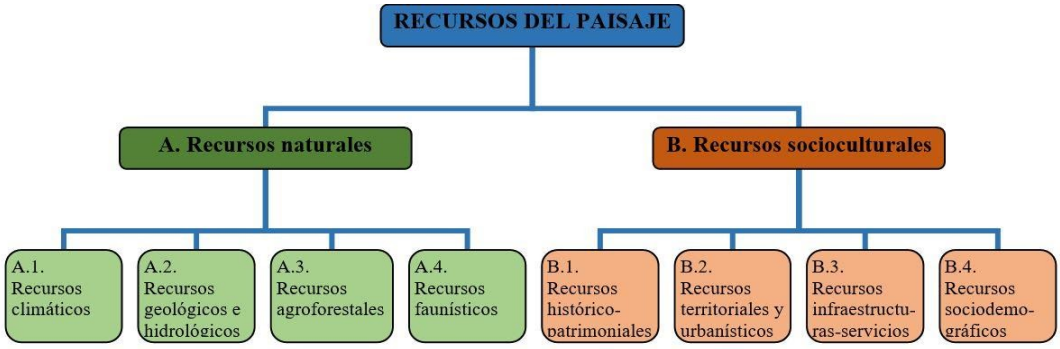


Figura 2. Esquema de organización de recursos del paisaje.

A. Recursos naturales en el paisaje

- **A.1. Recursos climáticos**

Enmarcado en el ámbito mediterráneo, el clima de la zona se encuentra determinado por la proximidad al mar. La temperatura media es de 17ºC y existe un gradiente pluviométrico este-oeste y norte-sur, con precipitaciones medias inferiores a 300 mm anuales, que no superan 150 mm en las vertientes marinas de Cabo Tiñoso; con lluvias concentradas en otoño a veces torrenciales (AEMET, 2017). En las proximidades a la costa, la humedad ambiental y las criptoprecipitaciones ocasionan descensos en la evapotranspiración y permiten mayores disponibilidades hídricas para la cubierta vegetal.

- **A.2. Recursos geológicos e hidrológicos**

El paisaje pertenece a las cordilleras Béticas, en el borde interno del dominio Bético. Se distinguen dos complejos tectónicos, el Nevado-Filábride al Norte y el Alpujárride en la mitad sudoriental, con características tectónicas intermedias entre ambos complejos (Peñas Blancas). El área incluye una amplia variedad geomorfológica, predominando los relieves calcáreos (calizas y dolomías), con gran pendiente en la franja litoral y con suaves mesetas hacia el interior, donde se levanta el pico de mayor altitud (629 m.): Peñas Blancas. Algunas rocas intrusivas afloran en el cruce de las numerosas fallas existentes, tanto afloramientos metamórficos (de poca entidad, en Cabo Tiñoso y al Noroeste del ENP) como afloramientos volcánicos basálticos postorogénicos, en varios cabezos del sector central y en la zona de La Muela, destacando el Cabezo Negro. Los valles y llanos cuaternarios incluyen cuencas de sedimentación atravesadas por cauces (Portús, Torre de Nicolás Pérez, Perín, Cuesta Blanca, Los Puertos…), valles interiores como la de Campillo de Adentro o derrubios de ladera y depósitos aluviales en los tramos finales de algunas ramblas como en La Azohía – Isla Plana (DGSCM, 2009). Los principales recursos edafológicos son los Litosoles en las partes más elevadas y de mayor pendiente del área ENP; Xerosoles, de tipo cálcico en hondonadas y laderas o de tipo o petrocálcico en valles coluviales; y Fluvisoles, en la parte baja de las cuencas y las ramblas (VVAA, 2000).

De entre los recursos geológicos de mayor interés, destacan los afloramientos volcánicos clasificados como Lugares de Interés Geológico (LIG): Cabezo Negro de Tallante y la Colada basáltica del Cabezo Negro (Arana Castillo *et al.,* 1989, 1999); o los más recientemente identificados: Cabezo Negro de Los Pérez y la Colada basáltica de la rambla de Peñas Blancas (Guillén Mondéjar *et al.,* 2019). Además de estos LIG, otros puntos de interés geológico son los acantilados calizos de la franja litoral entre Punta de la Azohía y El Portús, el Saliente rocoso metamórfico del Cabo Tiñoso, las paredes verticales calizodolomíticas de las Peñas Blancas, las huellas fósiles de Dátiles de Mar (*Lithophaga sp*.) de los acantilados y las grutas sumergidas del litoral (García Tortosa *et al.,* 2010).

La hidrología superficial del ENP se configuran fundamentalmente por ramblas, entre las que destacan las ramblas de Valdelentisco, El Cañar, La Azohía, y la del Portús, y otras que ocupan parcialmente el ámbito del ENP, como son La Algameca, Benipila y de Caveas. Por otro lado, la franja litoral está dominada por cuencas de pequeño desarrollo por donde discurren cursos de escasa longitud, dada la proximidad al mar de los relieves en grandes pendientes, destacando la rambla de Fatares desde el Cabezo del Roldán (DGMA, 2006). Respecto a la hidrología subterránea, los principales acuíferos son el del Campo de Cartagena; el de la Sierra de Cartagena y el confinado Cabezo del Horno. Asimismo, destacan pequeñas surgencias de agua de las ramblas de El Cañar y del Cabezo Negro (CHS, 2016).

- **A.3. Recursos agroforestales**

Las formaciones vegetales predominantes en el paisaje (DGMA, 2006; VVAA, 2005b) son las de matorral, que en algunas zonas del Espacio Natural alcanzan un elevado desarrollo, con individuos de gran porte. Destacan las comunidades de espartal (*Stipa tenacissima*) que suele ocupar algunas zonas de baja pendiente hacia el mar, acompañadas de otras de cornical (*Periploca angustifolia*) en zonas de solana de las vertientes marinas orientadas al sur y otros núcleos aislados, palmitar (*Chamaerops humilis*) en relieves preferentemente de umbría, espinar (*Rhamnus lycioides*), tomillar (*Thymus sp.),* o con comunidades freatófilas de baladral (*Nerium oleander*) o tarayal (*Tamarix canariensis*). Otras comunidades de matorral como los romerales (*Rosmarinus officinalis*), ocupan también suelos

metamórficos, junto con albaidales (*Anthyllis cytisoides*) o jarales (*Cistus sp*.), que cambian a palmitar en vaguadas y umbrías. Sin embargo, entre el matorral se intercala y conforma el sotobosque de algunas zonas boscosas, fundamentalmente de pinar de pino carrasco (*Pinus halepensis*) en laderas de exposición norte, y otras formaciones reducidas a pequeños núcleos, de carrascales (*Quercus rotundifolia*) o de sabinares termófilos de la sabina de Cartagena (*Tetraclinis articulata*). De menor porte aparecen comunidades de espacios específicos, tales como herbazales, saladares o vegetación de arenales y rupícolas. El núcleo de vegetación silvestre se rodea normalmente de cultivos de secano, que suelen contactar con los ambientes rurales o semiurbanos de Cartagena con vegetación de tipo pionero y nitrófilo como el hinojo (*Foeniculum vulgare*) o sosa blanca (*Atriplex glauca*), entre otros.

Esta vegetación, que alberga también algunas especies protegidas, se distribuye en 21 asociaciones vegetales, que componen los Hábitats de Interés Comunitario 6110*, 6220*, 6420, 8130, 8210, 92D0, 9340 y 9540 (VVAA, 2005b). Además, parte de estos recursos vegetales se han clasificado como Lugares de Interés Botánico (LIB) o Microrreservas Botánicas: "Carrascas del Collado de la Cruz-Tallante", "Fruticedas y roquedos de Peñas Blancas", "Matorrales de Los Ruices" y "Punta de la Azohía"; y en su entorno próximo, "Litosuelos de Galeras" y "Matorrales de Pérez Bajos" (VVAA, 2005a). Asimismo, es posible encontrar diversos árboles monumentales por su longevidad, tamaño o singularidad, como el Ciprés de Pozo Agüicas y del Inglés; las Encinas de la Rambla del Cañar y del Collado de la Cruz, los Garroferos de Galifa, de Juan Huertas, de la Casa del Pancho, de los Ingleses de Marinas, de Satu y de la Loma de la Asomada; los Lentiscos del Cañar y El Parrillar; y los Palmitos de la Cueva de Neptuno y del Pollo de la Raja (Carrillo López *et al.,* 2000; López Martín *et al.,* 2013).

Los recursos ligados a la agricultura se corresponden con el secano de almendro y, en menor medida, olivo; y asociados a estos cultivos, algunos algarrobos o higueras (en algunas vaguadas más húmedas). Los regadíos son excepcionales y aparecen en forma de pequeñas huertas. En zonas marginales y próximas a monte, se extienden pequeñas manchas de cereales (cebada y trigo, principalmente). Entre las variedades agrícolas tradicionales, destacan las de almendra (López Palazón, 1962; Rivera Núñez *et al.,* 1997), con importancia local de la "Mollar de Cartagena", y la variedad "Atascada" como denominación genérica local de un grupo de mayor rareza, además de otras como la "Fina del alto", la "almendra datilera" o de la variedad "Ramillete" en incremento en los últimos años.

- **A.4. Recursos faunísticos.**

El paisaje presenta importantes y diversas comunidades faunísticas debido a su amplitud territorial y la gran variedad de ambientes presentes (DGMA; 2006). Destacan especialmente las aves rupícolas, siendo nidificantes especies como búho real (*Bubo bubo*), águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*), águila real (*Aquila chrysaetos*) y halcón peregrino (*Falco peregrinus*); entre otras rapaces forestales o esteparias. Espacios aislados como pequeñas calas o grandes acantilados son utilizadas por aves marinas y acuáticas, como pardela cenicienta (*Calonectris diomedea*) o gaviota de audouin (*Larus audoinii*). Es posible encontrar además algunos paseriformes de óptimo desertícola, destacando el camachuelo trompetero (*Bucanetes githagineus*). Otras muchas especies de aves pueblan el ENP, alcanzando también hábitats asociados a cultivos agrícolas. Entre los anfibios y reptiles, destaca la especie vulnerable tortuga mora (*Testudo graeca*), con presencia de diversas especies de anfibios, lacértidos y culebras. Los mamíferos de mayor importancia en el paisaje son los quirópteros, con al menos cuatro especies de murciélagos, aunque la zona es importante para carnívoros como gineta (*Genetta genetta*), comadreja (*Mustela nivalis*) o garduña (*Martes foina*); siendo más frecuentes los zorros y mamíferos ligados a eriales y cultivos como conejos, jabalís, erizos, ratas y ratones.

Por otro lado, la ganadería tiene una importante presencia en el territorio, con una explotación fundamentalmente extensiva. La cabaña ganadera más extendida es el ganado ovino de raza segureña, para aprovechamiento principal de carne y residualmente de lana. Le sigue el ganado caprino de raza

murciano-granaína para aprovechamiento principal de leche. Más anecdótica es la explotación equina ligada a equitación, o la más reciente cría de caracoles. El resto de explotaciones ganaderas (porcina, avícola, cunícola, etc.) son escasas. Respecto a la caza, la modalidad cinegética principal es la caza de la perdiz roja con reclamo, tanto de perdiz natural como de perdiz de granja liberada, y en menor intensidad de codorniz. También existe caza de conejo, en modalidad de espera o en batidas de perros. La caza en espera del jabalí también se realiza, fundamentalmente justificada por daños agrícolas.

B. Recursos Socioculturales en el paisaje

- **B.1. Recursos histórico-patrimoniales**

La presencia de la actividad humana en el paisaje se muestra extensa en el tiempo, como atestiguan los yacimientos arqueológicos del entorno (Egea Bruno, 1999). Los primeros vestigios humanos aparecen en el entorno de cuevas, en la edad de piedra en la cueva de la Ovaza (Tiñoso) y la Cueva de Neptuno (Monte Roldán); y posteriormente, en el paleolítico superior en la Cueva del Caballo (Cañar), Cueva del Macho (Torre de Nicolás Pérez) y la Cueva Bermeja (Perín), y en el periodo eneolítico en las Cuevas de La Azohía. La llegada de la cultura argárica a la zona se evidencia en el yacimiento de Los Pérez de Arriba y, de manera más tardía, en el Poblado Ibérico (posteriormente también romano) de la Colada de Cuesta Blanca. Asociadas a la actividad agrícola en periodo romano aparecen construcciones hidráulicas como las Casas y Balsas Romanas de Galifa; y restos del comienzo del aprovechamiento minero en las Canteras del Cedacero y las Minas de Neptuno y en el cercano pueblo de Canteras (Ramallo Asensio, 2011), además de otros restos de la actividad romana en las cuevas de Peñas Blancas, Tallante (Los Paganos, El Cabildo y Las Vininas), La Hoya (Galifa), Casa de Pedro Sánchez (Valdelentisco), La Fuente Y-7 y Rambla del Portús.

En el s. XV-XVI se construyeron la Torre Vigía de Sta. Elena (Azohía), junto con la Torre de los Moros (La Corona) o la cercana Torre Rubia (Molinos Marfagones), que actuaban coordinadas para avisar de los ataques berberiscos que dificultaban la repoblación cristiana de la zona, permitiendo la recuperación de parte de la población hasta que algunas epidemias (s. XVII) y la emigración hacia Murcia y Valencia (s. XVIII) la volvió a mermar intensamente (Martínez López et al, 2009). Más avanzado el s. XVIII, la llegada de población cristiana favoreció nuevos asentamientos a los que vino asociada la construcción de ermitas como en Los Puertos de Santa Bárbara y Tallante, aprovechando en algunos casos antiguos templos como en Perín. El posterior crecimiento poblacional hizo levantar nuevas y humildes ermitas como en Galifa (1879), El Portús (1924) o El Rincón de Sumiedo (1940). También se desarrolló la actividad agraria lo que supuso, como en el resto del campo de Cartagena, la instalación de numerosos molinos harineros: Molino de Subiela (Tallante), Molino de la Boca del Cañar, Molino del Tío Ginés (Galifa), Molino de La Corona, Molino del Tío Lázaro (Galifa) y Molino del Tío Jarapa (Cuesta Blanca), entre otros (Aranda Mercader, 2000; Montaner Salas, 2004). También se desarrollaron infraestructuras asociadas al aprovechamiento del agua (Luján Ortega *et al.,* 2007; Berrocal Caparrós, 2007; García Moreno, 2007; González Blanco *et al.,* 2007; Montolla Inglés *et al.,* 2012.), desde finales del S. XIX, entre las que destaca “El Castillo de Perín”, o el más reciente Canal de Taibilla por el que transcurre el Acueducto de Perín y el Puente de Los Roses, que pueden considerarse un importante recurso científico, didáctico y ecoturístico (Gómez Espín *et al.,* 2012).

Es de importancia en la zona el valioso patrimonio militar, desde la Algameca en su parte oriental, con la Batería de la Parajola y del Roldán, hasta el Oeste, donde destaca la Batería de Castillitos y las baterías anexas del Atalayón, del Jorel y de la Loma Larga en Campillo de Adentro, fundamentalmente asociadas al Plan de Defensa de Primo de Rivera de 1926 (Schnell Quiertant, 2010). También es posible encontrar otros edificios militares construidos a lo largo del s. XX, tales como el cuartel de Boletes, el acuartelamiento de Campillo de Adentro y el cuartel del Portús; que en su mayoría han sido o están siendo restauradas con un fin residencial o ecoturístico.

- **B.2. Recursos territoriales y urbanísticos**

La ordenación territorial viene determinada por la confluencia de varias Administraciones Públicas con competencias en la zona, fundamentalmente el Ayuntamiento de Cartagena y la Región de Murcia, además del Estado en la gestión del dominio público marítimo-terrestre e hidráulico. El ámbito territorial del ENP se integra casi en su totalidad en el municipio de Cartagena, ocupando parcialmente las diputaciones de Perín, Los Puertos, Campo Nubla, La Magdalena y Canteras; si bien una muy pequeña porción ocupa los municipios de Mazarrón y Fuente Álamo. El paisaje cuenta con un amplio número de pequeñas entidades poblacionales de reducido tamaño; a los que se suman viviendas aisladas, caseríos y pequeños grupos de viviendas diseminadas. En un ejercicio de agrupación territorial, cabría destacar 12 entornos rurales principales que además cuentan con diseminados: Tallante, Los Puertos de Sta. Bárbara, Cuesta Blanca, Valdelentisco-Los Navarros, El Cañar, Perín, La Corona, Galifa, El Portús, Isla Plana, La Azohía y Campillo de Adentro.

Cabe destacar también la ocupación histórica del territorio con viviendas en una orientación preferente Sur-Sureste y crecimiento lateral de la vivienda y no en profundidad, pudiendo definir una tipología tradicional constructiva local (Lejarraga *et al.,* 2015) con el uso de materiales locales poco transformados con gran inercia térmica y estructura en materiales semisecos y terrosos, y cubierta a dos aguas o la más sencilla cubierta plana. Las viviendas suelen contar con construcciones anexas ligadas tradicionalmente al uso agrícola y/o doméstico (corrales, pozos, aljibes, depósitos, lavaderos, eras, etc.), que actualmente se transforman otros usos más ligados al ocio y la protección (piscinas, barbacoas, vallados, etc.), destacando los muretes de mampostería seca o semiseca (DGMA; 2014) como defensa o contención de terrazas agrícolas. Prevalece un aprovechamiento de la vivienda para periodos vacacionales y de fin de semana, como parece mostrar el alto porcentaje del uso de la vivienda como vivienda secundaria (el 60% en la principal zona censal, INE 2016), como ya fue descrito en otras zonas rurales de Murcia (López Bermúdez, 2006).

En relación a la propiedad, la titularidad privada es mayoritaria (92,3%), bajo un régimen principal de minifundios, donde la mayoría de propietarios (63%) no supera las 2 ha., con pequeñas parcelas agrarias de explotación fundamentalmente familiar, correspondiéndose las grandes parcelas con las áreas forestales (Jordán González *et al.,* 2010). En relación a la tenencia de la vivienda, el régimen en propiedad alcanza en la zona censal principal casi el 90%, siendo bastante superior al promedio municipal (INE, 2016). La propiedad pública se reduce al Dominio Público (Marítimo-Terrestre, Hidráulico, Urbanístico-Municipal y de Carreteras y Vías Pecuarias), las zonas de uso militar y los montes catalogados de utilidad pública M0501 La Algameca y M0504 Cabo Tiñoso y Algameca.

- **B.3. Recursos infraestructurales y de servicios**

Los consultorios médicos y farmacias que dan servicio en la zona se ubican fundamentalmente en las poblaciones de mayor tamaño del entorno y sus alrededores: Perín, Tallante, Isla Plana, y en Cuesta Blanca, La Azohía, y Canteras, donde también existen farmacias. Salvo por la existencia de colegio e Instituto en Tallante, el resto de servicios educativos se localizan fuera del ENP, tanto en Educación Infantil y Primaria (Canteras, Molinos Marfagones, Tentegorra, Isla Plana), como en Secundaria (Tentegorra), dependiendo por tanto de rutas de autobús escolar. Todos los centros son públicos, a excepción del Colegio privado de metodología “activa” de Tallante.

Existen varias carreteras que cruzan total o parcialmente la zona: RM-332 (Cartagena-Mazarrón), E-16 (RM-332 a E-22 por el Cedacero), RM- E21 (Canteras-Portús, con un ramal a Galifa), E-22 (E-16 a intersección RM-332 por Canteras) y RM- E23 (de Villa Luisa a E-16). Además, ocupan el paisaje otros caminos de menor entidad en El Roldán, La Muela, Boletes, o la Punta de La Azohía, entre otros. Asimismo, tradicionalmente se han utilizado algunas ramblas como vías de comunicación tales como en Los Jarales, La Bocaoria, El Cañar o El Esparrillar. Dos vías pecuarias, la Nº 2. Colada de la Cuesta del Cedacero y la Nº 8. Colada de Perín, atraviesan el ENP.

Las infraestructuras existentes para el uso público se relacionan con los bienes patrimoniales que sirven de atractivo turístico, entre los que destaca la batería militar de Castillitos y del Roldán, además de otros elementos del patrimonio militar, religioso (iglesias y ermitas) o agrario (molinos, ceñas y el destacado acueducto de Perín). Respecto a la oferta museística, el único museo de la zona es el Museo etnográfico de Los Puertos de Santa Bárbara. Además, en los últimos años se han habilitado miradores en Cuesta de Galifa, Los Ruices, Cuestas del Cedacero y Cabo Tiñoso, se ha mejorado la señalización del Espacio Natural y se han puesto a disposición diversos materiales divulgativos (mapa del ENP, de valores naturales, de valores culturales, de senderos…). La práctica deportiva utiliza el paisaje a través de los diversos senderos existentes en la zona: GR-92, PR-MU 7, PR-MU 106, PR-MU 107, PR-MU 115, PR-MU 116 y Ruta del Roldán; así como en las rutas de escalada entre las que destacan las de Peñas Blancas entre el resto: El Portús, La Muela, La Algameca, Cedacero y La Azohía (Ortiz Tudela, 2015). Otros deportes como parapente, espeleología o kayak se practican también en la zona.

Existen diversos servicios turísticos presentes en la zona, desde varios establecimientos de restauración hasta los no muy numerosos alojamientos rurales existentes en la Rambla del Cañar, Perín, Galifa; destacando el complejo ecoturístico de Campillo de Adentro y el camping naturista de El Portús. Otros servicios ecoturísticos que actúan en el paisaje son las rutas de kayak, con base en El Portús y La Azohía, la Escuela de Equitación de Puertos de Santa Bárbara, y algunas empresas especializadas de turismo natural, ornitológico o botánico que organizan actividades en la zona.

- **B.4. Recursos sociodemográficos**

El paisaje del ENP cuenta con un número de habitantes reducido y distribuido de manera irregular, concentrándose principalmente en algunos núcleos rurales y sus diseminados. Este conglomerado de pequeñas entidades poblacionales alberga un total de 1980 habitantes en el ENP y su entorno próximo, alcanzando su máximo poblacional en el año 2012, con 2286 habitantes (SMEC, 2017), como resultado de la evolución positiva que ha tenido la zona desde los años 90 (Ortín García *et al.,* 2013). El sector agroganadero muestra su importancia en la zona por el alto porcentaje de empresas y de empleados, siendo también destacable la ocupación en el sector servicios, además de otras ocupaciones técnicas, administrativas o industriales (INE, 2011), relacionadas con la función dormitorio de trabajadores debido a la cercanía del gran polo industrial de Cartagena.

La edad de la población que ocupa el paisaje tiene un promedio de más de 46 años, siendo considerablemente mayor que en la ciudad y el promedio municipal de Cartagena, al igual que la proporción de casados/as y viudos/as en relación a la de solteros/as (INE, 2011). El proceso de masculinización que ha caracterizado tradicionalmente las zonas rurales aparece también aquí desde 2012, con una tasa (1,07) ligeramente superior al promedio municipal, que alcanzó su pico máximo en 2015; si bien no es uniforme en el territorio, al no poder apreciarse un patrón claro de distribución en el territorio. La alta presencia de extranjeros (16,3%) es una cualidad diferenciadora del promedio municipal de Cartagena, si bien actualmente existe una pérdida de población extranjera desde el año 2008, cuando superó más del 25%. Las zonas más aisladas (Tallante, El Cañar, Valdelentisco…) poseen mayor tasa de extranjeros, con una preponderancia de población europea; al contrario que en las diputaciones más orientales más próximas a Cartagena donde la función dormitorio provoca la presencia de más población "mano de obra" de origen africano y americano, principalmente. La tasa de masculinización es mayor en la población extranjera (1,3) (SMEC, 2017).

El tejido asociativo presente en el entorno del ENP está bastante extendido, y cuenta con al menos una treintena de asociaciones con actividad diversa. Las asociaciones son mayor actividad son las (11) asociaciones vecinales y las (4) asociaciones de mujeres. Otro tejido asociativo bastante extendido es la 3ª edad, al contrario que las asociaciones juveniles que son inexistentes, a excepción de la de Perín, o las asociaciones culturales que en la zona aparecen ligadas a las principales parroquias. Respecto a

las asociaciones naturalistas, sólo la Asociación Renacuajos tiene su sede social en el ENP, si bien son activas en la zona otras del entorno como ADELA, ECUGA, ARBA, ANSE o SOLDECOCOS.

Los recursos etnológicos son numerosos y variados en el paisaje de la zona, existiendo diversas celebraciones, con cuadrillas locales de folclore y trovo, juegos populares locales como el caliche; además de una gastronomía de enorme riqueza (Sánchez Conesa, 2010). Destacan festividades como la "Subida del Burro" de Perín, la representación del arte tradicional de pesca de la Jábega de El Portús o romerías religiosas como la de la Rambla del Cañar, entre otras. Entre los recursos artesanales más destacables en la zona, destaca la práctica del esparto, cada vez más escasa.

Conclusiones

La identificación de los recursos del paisaje agroforestal del Espacio Natural La Muela, Cabo Tiñoso y Roldán sirve de ejemplo de la amplia diversidad de recursos que caracterizan los paisajes mediterráneos, incluyendo una extensa variedad de recursos climáticos, geológicos, hidrológicos, vegetales, faunísticos, histórico-patrimoniales, territoriales y arquitectónicos, de servicios públicos e infraestructuras, sociodemográficos, de tejido asociativo y de tipo etnológico.

La amplia diversidad de recursos paisajísticos identificados en paisajes mediterráneos como el existente en este territorio al oeste de Cartagena, nos traslada la importancia de la actividad humana en el modelado histórico del paisaje y la relación entre la continuidad de muchas de las prácticas humanas tradicionales y la conservación de muchos de sus elementos patrimoniales. El gran atractivo de este tipo de paisajes rurales y una mayor demanda social del uso del territorio ha ascendido el foco de atención social hacia el reconocimiento de sus recursos paisajísticos.

La identificación de estos recursos del paisaje permitirá interpretar los procesos que tienen lugar en el territorio y las nuevas funciones del paisaje asociadas al importante crecimiento en la actividad turística y residencial en los últimos años, que arrojan una gran potencialidad del paisaje como activo económico y social a la que pueden ir asociados nuevos riesgos para la conservación de los principales rasgos identificativos del paisaje.

El mejor reconocimiento de los recursos del paisaje permitirá diseñar medidas de gestión dirigidas a incentivar y priorizar el desarrollo de actividades generadoras de paisaje, fundamentalmente de tipo primario, que contribuyen a la conservación de los recursos naturales y culturales que lo componen, bajo la adaptación a los nuevos contextos socionaturales del paisaje y la consideración de las necesidades de la población local a través de su participación activa.

Bibliografía

Antrop, M., 2005. Why landscapes of the past are important for the future?. Landscape and Urban Planning. 70, 21–34. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2003.10.002

Antrop, M., 2006. Sustainable landscapes: contradiction, fiction or utopia?. Landscape and Urban Planning. 75, 187–197. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2005.02.014

Arana Castillo, R., Rodríguez Estrella, T., Mancheño Jiménez, M.A., y Ortiz Silla, R., 1989. Inventario de los Lugares de Interés Geológico de la Región de Murcia. Universidad de Murcia.

Arana Castillo, R., Rodríguez Estrella, T., Mancheño Jiménez, M.A., Guillén Mondéjar, F., Ortiz Silla, R., Fernández Tapia, M.T., y Del Ramo Jiménez, A., 1999. El Patrimonio Geológico de la Región de Murcia. Fundación Séneca, Consejería de Educación y Cultura. Recuperado de: https://www.igme.es/patrimonio/publicaciones/otros/patrimonio_geologico_murcia(ARANA).pdf

Aranda Mercader, J.D., 2000. Conoce el Oeste. Universidad Politécnica de Cartagena. Recuperado de: http://hdl.handle.net/10317/4039

Berrocal Caparrós, M.C., 2007. Sistemas tradicionales de extracción de agua en la pedanía de Galifa, Revista murciana de antropología, 14, 283-300. Recuperado de: https://revistas.um.es/rmu/article/view/107941

Carrillo López, A.F., Guerra Montes, J. y Sánchez Gómez, P., 2000. Árboles monumentales y singulares de la Región de Murcia y territorios limítrofes. Universidad de Murcia.

CHS (Confederación Hidrográfica del Segura), 2016. Plan Hidrológico de la Demarcación del Segura 2015-2021. Real Decreto 1/2016 de 8 de enero (BOE de 19 de enero de 2016). Recuperado de: https://www.chsegura.es/es/cuenca/planificacion/planificacion-2015-2021/plan-hidrologico-2015-2021/

DGMA (Dirección General de Medio Natural), 2014. Vallados en Espacios Naturales Protegidos. Calblanque y La Muela – Cabo Tiñoso. Folleto editado por la Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Recuperado de. https://murcianatural.carm.es/c/document_library/get_file?uuid=d886d128-33ba-4155-a200-71c1edab2bef&groupId=14

DGMN (Dirección General de Medio Natural), 2006. Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Espacio Natural de La Muela, Cabo Tiñoso y Roldán. Consejería de Industria y Medio Ambiente de la Región de Murcia. Recuperado de: http://www.borm.es/borm/documento?obj=anu&id=138280

DGSCM (Dirección General de Sostenibilidad de la Costa y el Mar), 2009. Estudio ecocartográfico del litoral de las provincias de Granada, Almería y Murcia. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Egea Bruno, P. M, 1999. Cartagena, imagen y memoria. Artelibro, Rafael Amorós.

García Del Barrio, J. M., Bolaños, F. y Elena-Roselló, R., 2003. Clasificación de los paisajes rurales españoles según su composición espacial. Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales. 12, 3, 5-17. http://dx.doi.org/10.5424/1075

García Moreno, P. y Sánchez Balibrea, J.M., 2007. Las norias de tiro en la rambla del Cañar y Rincón de Tallante (Sierra de Cartagena), testimonios de un paisaje del agua hoy casi olvidado. Revista murciana de antropología. 14, 199-210. http://hdl.handle.net/10201/4353

García Tortosa, FJ., López Garrido, AC, y Sanz de Galdeano, C., 2000. Las unidades de Cabo Tiñoso y Peñas Blancas: revisión y caracterización estratigráfica de las unidades alpujarrides del sector entre Mazarrón y Cartagena (Murcia, España). Estudios Geológicos. 56, 31-40. https://doi.org/10.3989/egeol.00561-2154

Gómez Espín, J. M. y Hervás Avilés, R. M. (coords.), 2012. Patrimonio hidráulico y cultura del agua en el Mediterráneo. Fundación Séneca, Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo. https://doi.org/10.14198/INGEO2013.60.10

Gómez Moreno, M.L., 2008. Los retos de la gestión del paisaje en la montaña mediterránea: relación entre tamaño, rentabilidad de la explotación y paisaje. Cuadernos geográficos de la Universidad de Granada, vol 43, nº 2, p. 327-350. https://doi.org/10.30827/cuadgeo.v43i0.1121

González Blanco, A., López Bermúdez; F. y Vera Boti, A., 2007. Los aljibes en la historia de la cultura: la realización en el Campo de Cartagena, Revista Murciana de Antropología, nº 14, p. 441-478. Recuperado a partir de https://revistas.um.es/rmu/article/view/108101

Guillén-Mondéjar, F, Romero Sánchez, G. Alías Linares, M.A., Rosillo Martínez, J.F., Manteca Martínez, J.I., De Santisteban Bové, C., Martínez Díaz, J.J., Pérez Salgado, B., Arrufat Milán1, L., Torrente, N., Navarro Sequero, A., López Sandoval, M., 2019. El inventario oficial de Lugares de Interés Geológico de la Región de Murcia. La actualización de 2018. En: Esther Martín-González, Juan J. Coello Bravo y Juana Vegas (eds.). Actas de la XIII Reunión Nacional de la Comisión de Patrimonio Geológico. Cuadernos del Museo Geominero, n.º 30. Instituto Geológico y Minero de España, Madrid. Recuperado de: https://www.igme.es/museo/publicaciones/cuadernos/PATRIMONIO%20GEOMINERO%20Sin%20NIPO.pdf

Hawkins, V. y Selman, P., 2002. Landscape scale planning: exploring alternative land use scenarios, Landscape and Urban Planning, nº 60, p. 211–224. https://doi.org/10.1016/S0169-2046(02)00056-7

Jordán González, E., Vicente Valero, M.V., Llorens Satorre, M., 2010. Análisis del paisaje y establecimiento de criterios ordenadores en materia de edificación rural en áreas protegidas de la Región de Murcia. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia (inédito)

Lejarraga, M., Castiñeira, E., y Gutiérrez, B., 2015. Tipologías constructivas tradicionales en el Espacio Natural de la Sierra de Muela, Cabo Tiñoso y Roldán, Actas al IV Congreso Nacional de Etnografía del Campo de Cartagena. Universidad Politécnica de Cartagena. Recuperado de: http://www.arte.upct.es/wp-content/uploads/2019/05/Actas-Congreso-Etnografia-Campo-Cartagena-2015.pdf

López Bermúdez, J.A., 2006. La transformación del paisaje en el regadío tradicional de la huerta de Mula, Papeles de Geografía, nº 44; p. 59-72. Recuperado a partir de https://revistas.um.es/geografia/article/view/43431.

López Martín, J.A. y Martínez Díaz, J.J., 2013. Catálogo de árboles monumentales y singulares del Municipio de Cartagena. Ayto. de Cartagena. Recuperado de: https://www.cartagena.es/gestion/documentos/19356.pdf

López Palazón, J. (1962): Variedades de almendras. Hojas divulgativas nº 19 y 20. Ministerio de Agricultura.

Luján Ortega, M. y García Martínez, T., 2007. El patrimonio de la cultura del agua en el paisaje del Campo de Cartagena. Revista murciana de antropología, 14, 567-602. Recuperado de: https://revistas.um.es/rmu/article/view/108151

Martínez López, F.J., Ayuso García, M.D., y García Díaz, I., 2009. El molino de viento en Cartagena durante el siglo XVIII. Murgetana, 120,129-160. Recuperado de: https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2982976.pdf

Martínez Sánchez, J., & Martínez-Carrasco Martínez, L., 2019. Procesos socioterritoriales de un paisaje rural en riesgo de "musealización": el ENP la Muela, Cabo Tiñoso y Roldán (Cartagena, España). Boletín De La Asociación De Geógrafos Españoles. 80. https://doi.org/10.21138/bage.2611

Mata Olmo, R., 2008. El paisaje, patrimonio y recurso para el desarrollo territorial sostenible: conocimiento y acción pública. Arbor: Ciencia, pensamiento y cultura, 729, 155-172. https://doi.org/10.3989/arbor.2008.i729.168

Montaner Salas, M.E., 2004. Aceñas y molinos de arcabuces en el paisaje del Campo de Cartagena. Revista murciana de antropología, 10, 121-128. Recuperado de: https://revistas.um.es/rmu/article/view/72331

Montoya Inglés, J. y Martínez López, F.J., 2012. Las norias de sangre de madera del Campo de Cartagena: componentes, características técnicas y arquitectónicas. Actas del 8º Congreso Internacional de Molinología, Diputación de Pontevedra.

Ortín García, J., y Cano Fuentes, G. I., 2013. Territorio, población y vivienda en la Región de Murcia 2001-2011. Papeles de geografía, 57-58, 209-223. Recuperado de: https://revistas.um.es/geografia/article/view/191341

Ortiz Tudela, J.C., 2015. Escaladas en el litoral murciano. Autoeditado.

Ramallo Asensio, S. F., 2011. Carthago Nova. Puerto Mediterráneo de Hispania. Darana Editorial, Murcia, 175p.

Rivera Núñez, D., Obón De Castro, C., Ríos Ruiz, S., Selma Ferrández, C., Méndez Colmenero, F., Verde López, A., y Cano Trigueros, F., 1997. Frutos secos, oleaginosos, frutales de hueso, almendros y frutales de pepita. Catálogo etnobotánico, vol. I, Universidad de Murcia.

Santos y Ganges, L. 2003. Las nociones de paisaje y sus implicaciones en la ordenación. Ciudades: Revista del Instituto Universitario de Urbanística de la Universidad de Valladolid, 7, 41-68. https://doi.org/10.24197/ciudades.07.2002.41-68

Sánchez Conesa, J., 2010. Ritos, leyendas y tradiciones del Campo de Cartagena. Editorial Cartagena Corbalán.

Schnell Quiertant, P., 2010. Los cañones "gigantes" del Plan de 1926; usos para la paz en el siglo XXI. Castillos de España: publicación de la Asociación Española de Amigos de los Castillos. 160, 45-55.

Serrano Giné, D., 2007. Paisaje y políticas públicas. Investigaciones Geográficas, 42, 109-123. https://doi.org/10.14198/INGEO2007.42.05

Silva Pérez, R., 2009. Agricultura, paisaje y patrimonio territorial. Los paisajes de la agricultura vistos como patrimonio. Boletín de la A.G.E. 49, 309-334. Recuperado de: https://hdl.handle.net/11441/73737

Tello Aragay, E., 1999. La formación histórica de los paisajes agrarios mediterráneos: una aproximación coevolutiva. Historia Agraria, 19, 195-212. Recuperado de: https://historiaagraria.com/FILE/articulos/HA19_tello.pdf

Vila I Subirós, J., Varga, D., Llausàs Pascual, A., y Ribas Palom, A., 2006. Conceptos y métodos fundamentales en ecología del paisaje. Una interpretación desde la Geografía. Documents d'anàlisi geográfica, 48, 151-166. Recuperado de: https://www.raco.cat/index.php/DocumentsAnalisi/article/view/72657

VVAA, 2000. Mapa Digital de Suelos de la Región de Murcia. Consejería de Agricultura, Agua y M.Ambiente.

VVAA, 2005a. Lugares de interés botánico de la Región de Murcia. Consejería de Industria y Medio Ambiente y Universidad de Murcia. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/260424628_Lugares_de_Interes_Botanico_de_la_Region_de_Murcia

VVAA, 2005b. Manual de interpretación de los hábitats naturales y seminaturales de la Región de Murcia. Consejería de Industria y Medio Ambiente de la Región de Murcia. Recuperado de: https://murcianatural.carm.es/web/guest/areas-protegidas/-/journal_content/56_INSTANCE_8Ffa/14/114330

HACIA UN ANÁLISIS DEL DESARROLLO TERRITORIAL EN LAS MARISMAS DE LA MARGEN IZQUIERDA DEL GUADALQUIVIR

MA. Falcón

Universidad Pablo de Olavide. Ctra. de Utrera, 1, 41013, Sevilla. miafasa@hotmail.com

Resumen

Las Marismas del Guadalquivir constituyeron hasta la segunda mitad del siglo XIX un mayúsculo espacio demográfico semivacío que no tenía un interés más allá de tierras de pasto para el ganado o la práctica de la caza. Para dar respuesta a la agravante situación socioeconómica de la época, se llevaron a cabo proyectos para la desecación de las marismas, que ha llegado hasta hoy como una de las zonas de producción agraria más importantes de Europa.

La situación actual es de elevada dependencia de las políticas agrarias y comerciales del momento, escasa transformación y diversificación de los productos, una población agraria envejecida con escaso relevo generacional, etc.; y basada en una estrategia sin atención a la biodiversidad necesaria para garantizar la supervivencia del espacio como socioecosistema.

La viabilidad futura va a estar condicionada a un modelo de desarrollo rural sostenible con el medio ambiente, y plenamente compatible con una revitalización social y económica del territorio. La investigación va a poner de manifiesto las variables que condicionan el área de estudio y así establecer un análisis y diagnóstico, donde la agricultura va a actuar como eje transversal en cada una de la triple entrada indicada anteriormente para un desarrollo integrado.

Palabras clave: marismas, Guadalquivir, desarrollo, rural, sostenible

TOWARDS AN ANALYSIS OF TERRITORIAL DEVELOPMENT IN THE MARSHES OF THE LEFT MARGIN OF GUADALQUIVIR

Abstract

Until the second half of the 19th century, the Guadalquivir marshes were a major semi-empty demographic space that had no interest beyond pasture land for cattle or hunting. In order to respond to the aggravating socio-economic situation of the time, projects were carried out to dry out the marshes, which has survived to this day as one of the most important agricultural production areas in Europe.

The current situation is one of high dependence on the agricultural and commercial policies of the moment, little transformation and diversification of products, an aging agrarian population with little generational change, etc.; and based on a strategy without attention to the biodiversity necessary to guarantee the survival of the space as a socio-ecosystem.

The future viability will be conditioned to a sustainable rural development model with the environment, and fully compatible with a social and economic revitalization of the territory. The research will reveal the variables that condition the study area and thus establish an analysis and diagnosis, where agriculture will act as a transversal axis in each of the triple entry indicated above for integrated development.

Keywords: marshes, Guadalquivir, development, rural, sustainable

Objetivo

Puesta en valor del medio rural por su origen y trayectoria, no solo a nivel regional y nacional, sino también dentro del marco europeo y fuera del mismo. A partir de este conocimiento se van a poner en relieve las transformaciones necesarias para hacer frente a los requerimientos y demandas que presentan la sociedad actual, fruto del análisis y evaluación de las distintas variables que determinan y caracterizan al territorio estudiado.

Situación

El ámbito geográfico seleccionado se encuentra en la provincia de Sevilla, formando parte de la comarca del Bajo Guadalquivir y comprende 27.509 ha de las marismas del Guadalquivir en su margen izquierda (figura 1).

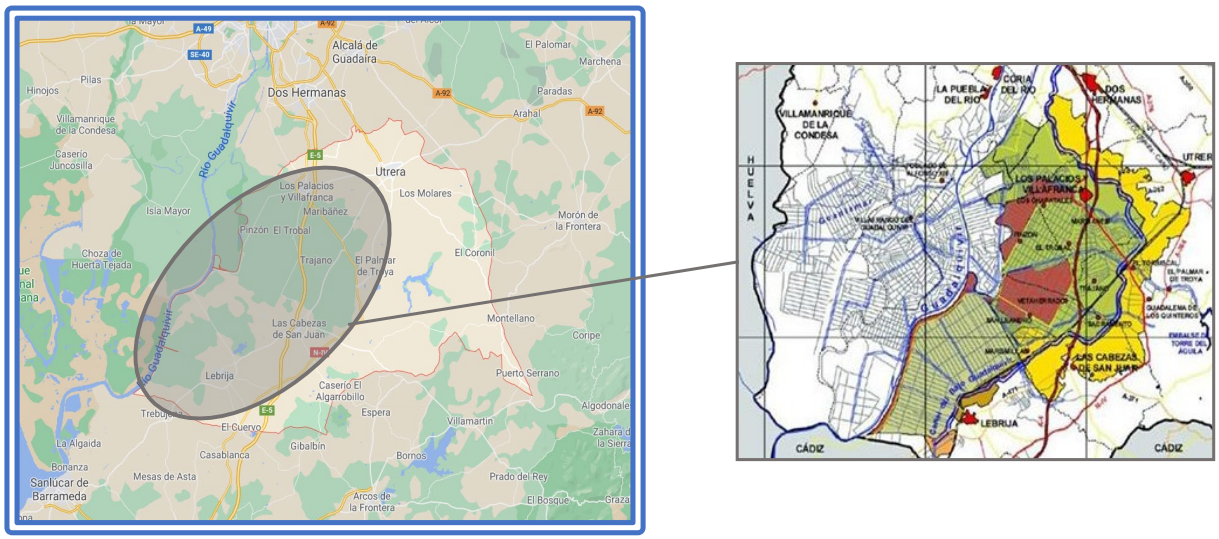


Figura 1. Ámbito de actuación.

A nivel edafológico, el espacio destaca por su planitud siendo los materiales predominantes de tipo sedimentario muy reciente: limos, arcillas, margas, arenas y gravas.

El clima mediterráneo-continental es el que caracteriza la zona; la precipitación anual ronda los 500-700 mm y la temperatura media alcanza los 18ºC. Sin embargo, el cambio climático está provocando unas temperaturas medias más altas unido a unas precipitaciones más irregulares y escasas.

El censo de población es de 133.446 habitantes (97,12 hab./km2) con una renta media de 13.535,81 €/hab. y una tasa de desempleo de 31,62 %.

Descripción

La concepción de desarrollo territorial en las marismas de la margen izquierda del Guadalquivir (MMIG) se va a basar en los tres pilares estratégicos que articulan y cohesionan la comarca como se refleja en la figura 2, es decir, un modelo de desarrollo rural sostenible con el medio ambiente, y a su vez plenamente compatible con la revitalización social y económica del territorio, donde la agricultura juega un papel crucial como eje transversal positivo en cada una de la triple entrada del desarrollo territorial.



Figura 2. Desarrollo territorial.

Para la caracterización de cada uno de los tres vértices del triángulo (en alineación y coherencia con los ODS para conseguir un mundo más sostenible en todos sus ámbitos: sociales, ambientales y económicos), se distinguen aquellas variables con mayor peso e influencia en el territorio, en aras de conocer el grado de desarrollo de las MMIG mediante una comparativa con la situación global de la región (Pita y Pedregal, 2011).

Así mismo, al ser variables que no son inamovibles en el tiempo, y que van a depender de las circunstancias y requerimientos del momento, se va a establecer una observación diacrónica de las mismas, analizando un periodo lo suficientemente extenso para su investigación. Sin olvidar los antecedentes previos, se va a poner en relevancia el nuevo milenio por los significativos cambios que afectan al devenir del territorio.

El desarrollo territorial se ha vinculado al crecimiento económico, sin embargo, en los periodos de crisis, es igualmente importante medir la resiliencia, como la resistencia o respuesta de los territorios ante cambios externos o situaciones de shock (Hill et al., 2008)

El concepto resiliencia en el ámbito territorial se refiere a la capacidad para prepararse, resistir o adaptarse a situaciones diversas (crisis económica, financiera, social o política; desastres naturales, ecológicos, industriales o epidemiológicos; cambio climático; cambio tecnológico; etc.) que inciden sobre los elementos del territorio, la población y sus actividades (empresas, instituciones, mercados, estructuras, sectores, etc.) (Hamdouch et al., 2012). A partir de esta definición, se pueden distinguir cuatro fases de la resiliencia territorial (figura 3): 1) anticipación, preparación; 2) respuesta; 3) recuperación; y 4) adaptación y aprendizaje en el largo plazo.



Figura 3. Resiliencia territorial

De este modo, el periodo de investigación viene determinado por los diferentes cambios por el nuevo marco normativo para el territorio junto con otras situaciones avenidas de crisis que terminan influyendo en su comportamiento y su capacidad de reacción para su desarrollo, a lo que se ha hecho referencia anteriormente como resiliencia territorial en sus diferentes fases (Sánchez Zamora, 2015). La figura 4 recoge los periodos considerados para el análisis.

Entre el 2000 y 2007, se considera la primera etapa 'anticipación y preparación', que se inicia con la Agenda 2000, en el que desarrollo rural se incorporó como segundo pilar de la PAC, y a nivel económico fue una etapa estable caracterizada por el crecimiento económico, especialmente el sector construcción.

La segunda etapa de 'respuesta' a la crisis económica mundial, se establece como el periodo comprendido entre los años 2008 y 2014, que tuvo drásticas consecuencias en España debido a su fragilidad económica y que terminó afectando en mayor o menor medida a todas sus regiones.

A continuación, se produjo una etapa de 'recuperación' entre los años 2015 y 2020, y que está marcada por la aprobación Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible en el año 2015, y finalizó con una nueva crisis global de índole sanitaria debido a la COVID-19, cuyas repercusiones económicas están pendientes de contabilizar en las estadísticas oficiales. Además, la puesta en marcha de una nueva PAC, así que este último periodo se va a poner de manifiesto la fase de 'adaptación' del territorio a la nueva situación establecida y al aprendizaje adquirido para afrontar nuevas alteraciones en el largo plazo.

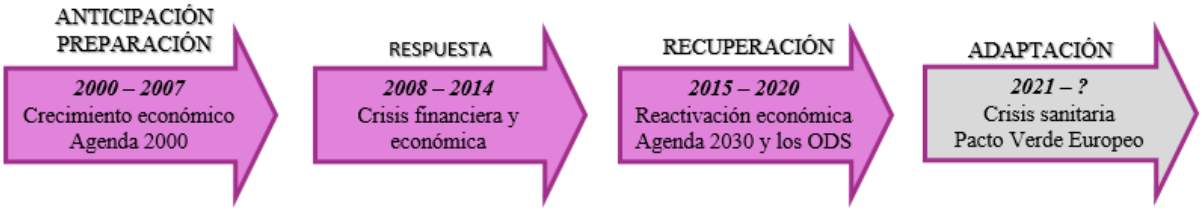


Figura 4. Periodos de análisis

A partir de la revisión de la bibliográfica, se ha llevado a cabo el procedimiento metodológico que permite el análisis del desarrollo territorial. En la figura 5 se recoge el esquema que se lleva a cabo para la investigación.

En una primera fase se ha elaborado una base de datos considerando los indicadores que caracterizan al territorio rural en sus tres dimensiones de sostenibilidad: Económica, social y ambiental.

A partir de este sistema de indicadores, se ha continuado con el análisis de la resiliencia territorial para ver la evolución en los periodos considerados a través de una selección de indicadores, que va a permitir una valoración de la dinámica territorial del espacio rural y así establecer unos resultados y conclusiones.

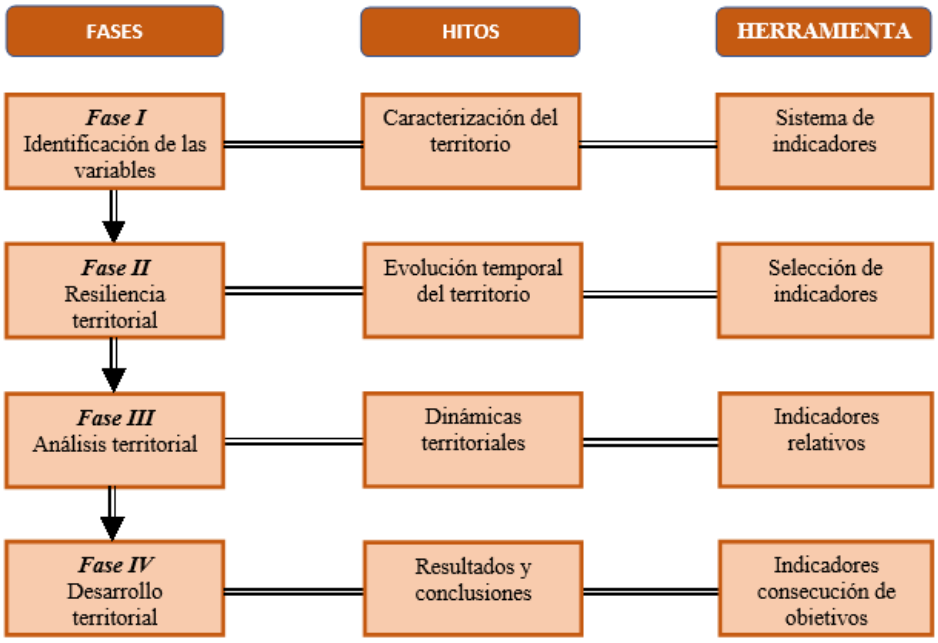


Figura 5. Esquema metodológico.

Resultados y Discusión

Fruto de la dos primeras fases de investigación se procede a caracterizar el territorio para ver la evolución y dar una aproximación de la situación actual, haciendo referencia a los indicadores que se han seleccionado para el análisis.

La comarca que abarca las MMIG presenta un incremento demográfico positivo, por encima de Andalucía y España, por lo que actualmente no existe amenaza de pérdida de población. Ese crecimiento tiene su origen tanto en factores vegetativos, como de inmigración, siendo ambos favorables. Esa dinámica poblacional constituye por tanto una fortaleza para el territorio.

Los datos de renta media declarada suponen una debilidad, pues se encuentran notablemente por debajo de los datos de Andalucía, sin embargo, del mismo modo por encima de la media española.

En lo que respecta a la actividad económica, se muestra una destacada vocación primaria con un porcentaje de superficie agraria muy elevado, específicamente de regadío en el espacio investigado. Se tratan de explotaciones de tamaño medio, 12 ha en la marisma al inicio de la colonización, pero en los últimos años se ha tendido a la concentración de la tierra por diversos factores como la falta de relevo generacional y la llegada de inversiones ajenas al sector, en una tendencia con la superficie media de explotación en Andalucía (22,7 ha) y con la superficie estatal (25 ha).

Una parte de la producción se concentra en cultivos excedentarios y/o sometidos a la fuerte competencia internacional, en los que la existencia de subvenciones condiciona la actividad (Industriales y cereales, aproximadamente el 80%) como se puede observar en la figura 6. Esos cultivos conviven con producciones hortícolas extensivas más competitivas que se destinan al consumo en fresco y a la transformación, que ha tenido una evolución al alza en los últimos años por su gran rentabilidad y adaptación al espacio rural.

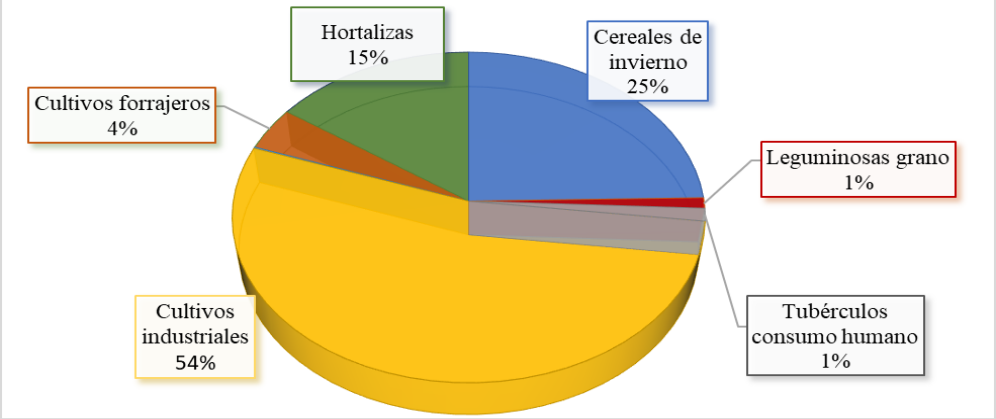


Figura 6. Distribución de cultivos

Sin embargo, no existe una suficiente diversificación productiva, según se pone de manifiesto en el proceso de participación. Y en cuanto a la producción ecológica sigue siendo de escasa relevancia en la comarca.

Se puede extraer una clara tendencia negativa respecto al empleo agrario (figura 7), donde influyen otros factores claves para el sector, como son las sucesivas reformas de la PAC, y fundamentalmente un cambio de paradigma en la agricultura, con una mayor mecanización y automatización de los procesos agrícolas. Y fundamentalmente la globalización de los mercados, con la ampliación de las zonas cultivables en todo el planeta y a menor coste de producción en la mayoría de los casos.

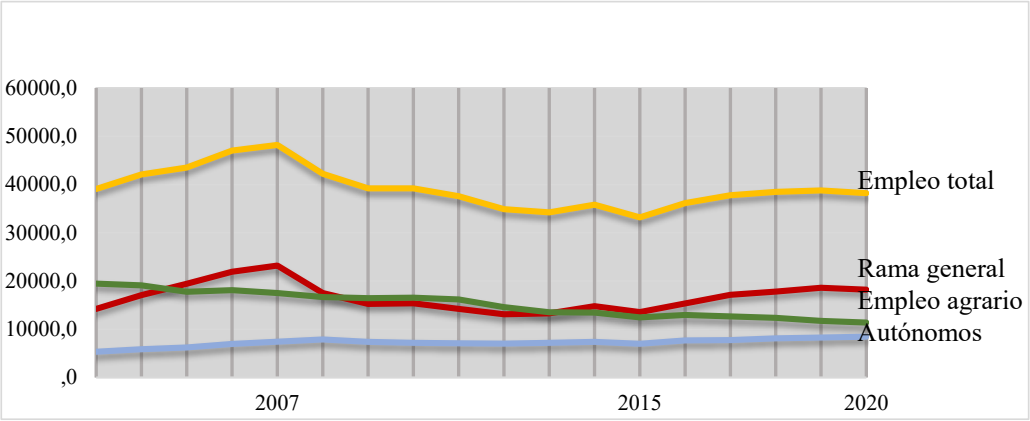


Figura 7. Afiliación a la seguridad social

El sector industrial se encuentra fuertemente condicionado por la actividad agraria, lo cual supone una fuente de generación añadido en la comarca, aunque insuficiente. El sector servicios tiene una clara orientación al comercio, siendo el principal empleador de mano de obra femenina.

Se pone de manifiesto como una debilidad los déficits de formación, cuestión que afecta tanto a los empresarios, como a los trabajadores y a los desempleados. Sin embargo, la actividad productiva tampoco es capaz de generar puestos de trabajo para aquellos jóvenes con mayores niveles de formación, lo que favorece la salida de los mismos de la comarca. Esos déficits formativos pueden estar detrás de los menores niveles de iniciativa empresarial e innovación que se identifican en la comarca.

En general, las ratios de empresas y establecimientos empresariales por cada mil habitantes son desfavorables para la comarca, como también es menor su tamaño en función del empleo, lo que muestra la debilidad relativa del tejido productivo.

Conclusiones

La supervivencia y prosperidad del espacio rural de las MMIG viene determinada por la implantación de una estrategia innovadora en su sentido más extenso tal como se indica en la figura 8, es decir, no sólo centrada en la importante vertiente material (capital natural, productivo y físico-territorial), sino sobre todo a nivel de intangibles (capital humano y social), que se consideran fundamentales para la articulación de todos los procesos de desarrollo, tales como el saber hacer, el espíritu empresarial y de cooperación, etc. (Silva y Moral, 2005).

Se refiere a diversificación de los cultivos agrícolas, gracias a la disponibilidad de los recursos naturales, especialmente los hídricos, pero con una necesaria optimización de los mismos. Unido a una mayor competitividad a través de un progreso en la transformación de los insumos primarios producidos. Para ello, es clave la formación y la capacitación, fundamentalmente para los jóvenes y las mujeres, arraigando la población al territorio.

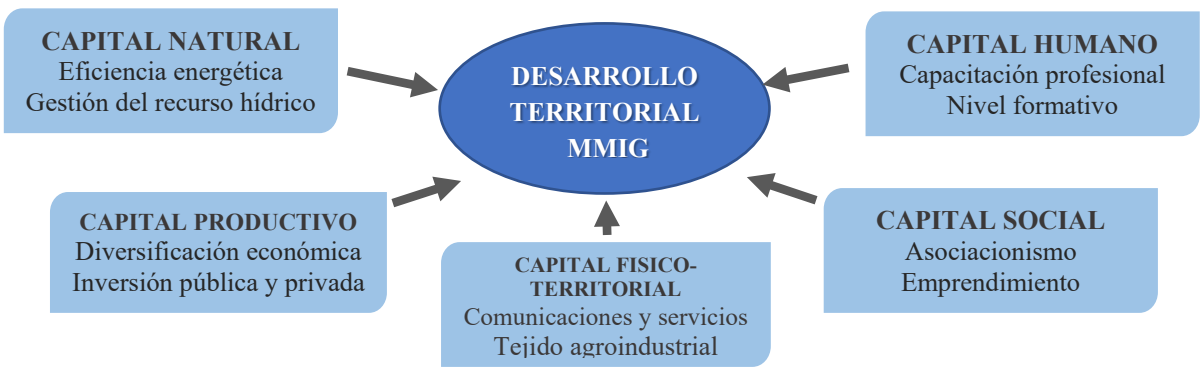


Figura 8. Desarrollo territorial en las MMIG.

Referencias

Cruz Villalón, J. (1996). El Mapa de la política de colonización en Andalucía. Investigaciones Geograficas.

García García, A. (2012). El dinamismo socioeconómico de Andalucía. Territorios ganadores y territorios emergentes. Universidad de Sevilla. Secretariado de publicaciones.

Molinero, F. (1990). Los espacios rurales: agricultura y sociedad en el mundo.

Pita López, M.F. y Pedregal Mateos, B. (2010). Tercer informe de desarrollo territorial de Andalucía. Tercer informe de desarrollo territorial de Andalucía.

Plan Estratégico de España para la PAC post 2020 (2021). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Plan Estratégico para mejorar la competitividad del sector agrícola, ganadero, pesquero, agroindustrial y del desarrollo rural de Andalucía 2020 – 2022. (2020). Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía.

Sampedro Sánchez, D.; Abreu Fernández, L.; Guisado Muñiz, A.; Del Moral Ituarte, L.; Pedregal Mateos, B. y Silva Pérez, R. (2005). Crisis y reestructuración de grandes zonas regables en Andalucía: el caso del Bajo Guadalquivir. Industria y minería.

Sánchez Zamora, P. (2015). Crisis y ruralidad. Un análisis de los factores de resiliencia en los territorios rurales de Andalucía. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba. http://hdl.handle.net/10396/12501

Silva Perez, R.; Moral Ituarte, L. (2005). Nuevas dinámicas socioeconómicas y alternativas de desarrollo territorial. El caso de la zona regable del Bajo Guadalquivir. Boletín de la Asociación de Geógrafos Españoles.

Villanueva Paredes, A.; Leal Maldonado, J. (1990). La planificación del regadío y los pueblos de colonización. Madrid: MAPA, MAP, MOPU.

Sesión 10:

Procesado e Innovación en Productos de Origen Animal.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Reformulación de hamburguesas de ternera con geles de emulsiones de agua y aceites vegetales

A. Gea-Quesada, E. Sayas-Barberá, C. Botella-Martínez y M. Viuda-Martos

Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior Orihuela, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3,2 (03312) Orihuela, Alicante: aaron.gea@goumh.umh.es

Resumen

La reformulación de los productos cárnicos para reducir o sustituir su contenido en grasa animal es una tendencia que surge a partir de la mayor preocupación del consumidor por la salud y el medio ambiente. Uno de los problemas para incorporar grasas de origen vegetal a los productos cárnicos es la dificultad para integrarse en la matriz cárnica. La emulsión de aceite en agua (O/W) surge como una prometedora tecnología para incorporar grasas de origen vegetal a productos cárnicos reemplazando las grasas de origen animal. En este caso se estudia la sustitución de grasa de cerdo al 25% y al 50% por emulsiones con harina de amaranto y dos tipos de aceites vegetales: (S1) aceite de chía (*Salvia hispanica L.*) y (S2) aceite de cáñamo (C*annabis sativa spp. sativa*). El porcentaje de grasa disminuyó en función del porcentaje sustituido, siendo las hamburguesas con un 50% de sustitución las de menor contenido. El estudio de vida útil en congelación demostró ser un buen método para su conservación, manteniendo constantes los parámetros fisicoquímicos estudiados. Además, el aceite de cáñamo como ingrediente en las emulsiones gelificadas actuó como un protector frente a la oxidación de los lípidos en comparación con el aceite de chía, que mostró los mayores valores de oxidación.

Palabras clave: hamburguesas reformuladas, emulsión, amaranto, aceite de chía, aceite de cáñamo.

Reformulation of beef burgers with water emulsion gels and vegetable oils

Abstract

The reformulation of meat products to reduce or replace their animal fat content is a trend that arises from the consumer's greater concern for health and the environment. One of the problems in incorporating fats of vegetable origin into meat products is the difficulty of integrating them into the meat matrix. Oil-in-water (O / W) emulsion emerges as a promising technology for incorporating fats of vegetable origin into meat products, replacing fats of animal origin. In this case, the substitution of 25% and 50% pork fat by emulsions with amaranth flour and two types of vegetable oils is studied: (S1) chia oil (Salvia hispanica L.) and (S2) hemp oil (Cannabis sativa spp. Sativa). The percentage of fat decreased as a function of the percentage substituted, being the hamburgers with a 50% substitution the ones with the lowest content. The study of shelf life in freezing proved to be a good method for its conservation, keeping the physical-chemical parameters studied constant. Furthermore, hemp oil as an ingredient in gelled emulsions acted as a protector against lipid oxidation compared to chia oil, which showed the highest oxidation values.

Keywords: reformulated hamburgers, emulsion, amaranth, chia oil, hemp oil.

Introducción y Justificación

El sector cárnico representa en la industria alimentaria el 22% de su valor en el mercado, traduciéndose en un 2,4% del PIB español (Fecic, 2020). Debido al surgimiento de nuevas tendencias entre los consumidores de una sociedad en constante cambio, es necesario que la industria cárnica se adapte a las crecientes exigencias del mercado. Además de una calidad y seguridad alimentarias óptimas, los consumidores demandan propiedades más saludables, productos de conveniencia, económicos y capaces de adaptarse a nuevas tendencias. La presencia de ingredientes saludables y el contenido en grasas de los productos cárnicos son los dos factores más influyentes en la decisión de compra del consumidor en países desarrollados (Shan et al., 2017). Para ampliar el mercado se investigan nuevas fórmulas para estos productos, bien sea reduciendo el contenido en grasa y sal, o bien incorporando ingredientes funcionales para enriquecer el perfil nutricional del producto. La modificación del perfil lipídico sustituyendo los ácidos grasos saturados por insaturados es una de las estrategias a seguir en los derivados cárnicos (salchichas, longanizas frescas, mortadela…) para reducir las alarmantes cifras de obesidad y sobrepeso en España y el resto de Europa (AESAN, 2018).

El amaranto es un pseudocereal originario de América que ha sido investigado como potencial ingrediente funcional por su elevado valor nutricional y sus propiedades beneficiosas para la salud, ya sea en grano o en otros formatos como harinas y extractos. El grano de amaranto contiene (en materia seca) entre un 12,5% y un 15,5% de proteínas, que lo convierte en una gran fuente de proteínas de origen vegetal. Entre un 7% y un 8% de lípidos, del 73,7% al 77,0% de carbohidratos (incluida la fibra alimentaria, en su mayoría insoluble) y de un 3,0% a un 3,5% de contenido mineral, entre los que destacan: Ca, P, Fe, K y Zn. También es una fuente de vitaminas y compuesto fenólicos con cierta capacidad antioxidante, como el ácido cafeico, el ácido ferúlico y otros flavonoides (López et al., 2019). La harina de amaranto ha demostrado una buena capacidad emulsionante, sin verse afectada por la adición de sales que suelen ser incorporadas a productos preparados. En productos cárnicos ya se ha incorporado a snacks de carne de bajo contenido en grasa con resultados positivos, reduciendo el contenido en grasa de las muestras y con buena aceptación sensorial (Singh et al., 2019; Britez et al., 2020; Zhu, 2020).

Las grasas de origen vegetal son una preferencia en la población por su elevado contenido en ácidos grasos insaturados (AGI), poliinsaturados (AGPI), y antioxidantes, con efectos beneficiosos demostrados para la salud como la reducción de la aparición e incidencia de enfermedades cardiovasculares, la disminución del estrés oxidativo y la prevención de algunos tipos de cáncer como colorrectal, de hígado o de próstata entre otros (Krebs et al., 2006; Abel, Riedel y Gelderblom, 2014; Bowen, Harris y Kris-Etherton, 2016). El principal inconveniente de la incorporación de este tipo de aceites a los productos cárnicos como hamburguesas o salchichas que incorporan grasas a las formulaciones, es la incapacidad de la matriz cárnica de formar una masa estable, quedando la matriz bañada en aceite que se pierde en su mayoría durante el cocinado. Para la incorporación de aceites ricos en AGPIs, se ha estudiado su aplicación mediante emulsiones gelificadas (GEs). Pourashouri et al. (2020) utilizó una emulsión de aceite en agua (o/w) de pescado junto a agentes gelificantes (carragenatos) y extractos de té verde como ingrediente en salchichas de pescado, obteniendo una menor oxidación de los lípidos y una menor pérdida de peso y dimensiones en los rendimientos de cocción. También se ha investigado utilizando gelificantes de origen natural como hidrolizados de proteína de soja o de caseínas, ofreciendo también resultados prometedores de las emulsiones o/w gelificadas como sustitutos funcionales de las grasas animales en productos cárnicos reformulados (Freire et al., 2018). El uso de GEs puede causar diferencias en parámetros como la oxidación de los lípidos, en los rendimientos de cocción o en las variables de textura tras la conservación en

congelación (Tª < -18ºC), siendo interesante el estudio de su almacenamiento (Pintado et al., 2015). Ozturk-Kerimoglu et al. (2019) utilizó GEs con aceite de semillas de higo como estrategia para reformular salchichas fermentadas, obteniéndose las mayores oxidaciones de lípidos al final del almacenamiento en las salchichas control.

El aceite de chía (*Salvia hispanica L.*) y el aceite de cáñamo (C*annabis sativa spp. sativa*) son aceites vegetales obtenidos a partir de las semillas de sus plantas. Son semillas ricas en AGPI como el ácido linoleico (ω-3 o su isómero ω-6), concretamente las semillas de chía son una de las mayores fuentes en este ácido graso esencial, además de contener algunos compuestos funcionales como antioxidantes y fitosteroles (Ciftci, Przybylski y Rudzinska, 2012). El aceite de cáñamo por otra parte también es una fuente de ácidos grasos AGPI, destacando sus usos como ingrediente funcional tanto en alimentación humana como animal (Carus y Sarmento, 2016) por sus propiedades nutricionales y su versatilidad como ingrediente. Utilizado en otros formatos (semillas enteras, semillas descascaradas y harina) como ingrediente funcional en pasteles de carne, aumentando la cantidad de AGPI en los productos finales, disminuyendo los procesos de oxidación y mostrando cualidades organolépticas similares a los productos control (Zajac et al., 2019).

El objetivo de este estudio fue la caracterización de hamburguesas de ternera reformuladas, sustituyendo parte de la grasa de cerdo por emulsiones gelificadas de aceites de origen vegetal en agua en un 25% y un 50% de sustitución. Además, por sus propiedades nutricionales y tecnológicas se incorporó harina de amaranto en la emulsión. Para la caracterización del producto final se estudió: la composición centesimal mediante un análisis proximal (humedad, proteínas, grasas totales y cenizas), los efectos de la cocción (rendimientos de cocción, capacidad de retención de agua (CRA) y capacidad de retención de aceite (CRO), las propiedades fisicoquímicas (pH, color, textura y oxidación de lípidos), y un análisis sensorial realizado por un panel de jueces entrenados. Por último, se discuten sus posibilidades de desarrollo como producto y las perspectivas de la tecnología aplicada.

Materiales y métodos

Elaboración de emulsiones gelificadas y producción de hamburguesas

Para elaborar las emulsiones se utilizó una Thermomix y se añadió agua (47%) y los gelificantes Instagel (1,5%) y goma Gellan (1,5%) durante 2 minutos a 60ºC, después se añadió la harina de amaranto (10%) y se mezcló durante 1 minuto. Se dejó enfriar durante 3 minutos sin dejar de mezclar hasta los 37º C y se añadió el aceite de chía o cáñamo (40%) lentamente, dejando emulsionar durante 5 min. Finalmente se envasó y se almacenó a temperatura de refrigeración hasta la elaboración de las hamburguesas.

Se elaboraron cinco lotes de hamburguesas durante los dos primeros días del estudio, que se clasificaron en función de la emulsión gelificada utilizada como sustituto de grasa (S1 para las GEs de aceite de chía y S2 para las GEs de aceite de cáñamo) y en función de la proporción sustituida de grasa de cerdo (25% o 50% de sustitución), quedando un lote control siguiendo la receta tradicional. Los lotes fueron: control, S1-25, S1-50, S2-25 y S2-50. En la Tabla 1 se resume la formulación de cada uno de los lotes.

Tabla 1. Formulaciones alimentarias (%) de los lotes de hamburguesas reformuladas con GEs (emulsiones gelificadas).

	Tratamiento (%)				
Ingredientes	**Control**	**S1-25**	**S1-50**	**S2-25**	**S2-50**
Carne magra de ternera	80	80	80	80	80
Grasa de cerdo	20	15	10	15	10
Agua	5	5	5	5	5
Sal	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Pimienta	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GE chía	0	5	10	0	0
GE cáñamo	0	0	0	5	10

En primer lugar, se mezclaron la carne magra de ternera y la sal, a continuación, se añadió el agua a la masa, y por último la pimienta, la grasa de cerdo y las emulsiones según correspondió. Las hamburguesas se almacenaron en refrigeración durante toda la noche hasta el día siguiente que se analizaron (muestras a día 0). El resto de hamburguesas se conservaron envasadas al vacío a temperaturas de congelación hasta su análisis los días 30 y 60, evaluando las posibles variaciones que pudieran haber sufrido a causa de la reformulación.

Análisis proximal

En cuanto al análisis proximal de los lotes, se midieron los siguientes parámetros: proteínas, grasas, humedad y cenizas. Todos ellos se midieron siguiendo los métodos recogidos por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2010). Para determinar la cantidad de proteínas se siguió el método Kjeldhal, utilizando 6,25 como factor de conversión de nitrógeno. La determinación de grasas se realizó mediante extracción de grasas de la muestra y su posterior análisis por gravimetría. Con un equipo de extracción de grasas *Soxhlet* se aisló la grasa contenida en las muestras. La cantidad de grasa (%) se determina mediante diferencia de peso del vaso de extracción (m_0 vacío) con la grasa (m_2) y el vaso de extracción con la muestra (m_1) siguiendo la siguiente Ecuación (1):

$$\%\ grasa = \frac{(m_2 - m_1)*100}{m_0} \qquad (1)$$

Para analizar el contenido de humedad se utilizó un método gravimétrico por diferencia de peso tras deshidratación de las muestras. Con el recipiente desecado tarado (h_0) y sin humedad (102ºC durante dos horas), se pesó la muestra (h_1) y se llevó a secado en estufa durante 24 horas a 105ºC. Tras atemperarse en el desecador se pesaron (h_2), debiéndose las pérdidas a la humedad contenida en las muestras, la humedad se determinó siguiendo la siguiente Ecuación (2):

$$\%\ humedad = \frac{(h_1 - h_2)*100}{(h_1 - h_0)} \qquad (2)$$

El contenido de cenizas se determinó también mediante un método gravimétrico, por diferencia de peso tras pasar las muestras por la mufla. Con el recipiente desecado tarado (c_0), se pesó la muestra (c_1) y se llevó a la mufla (550ºC durante 8 horas). La ceniza que queda en los recipientes se pesa junto a éstos (c_2) y la proporción de cenizas se determinó siguiendo la siguiente Ecuación (3):

$$\%\ cenizas = \frac{(c_2 - c_0)*100}{(c_1 - c_0)} \qquad (3)$$

Propiedades fisicoquímicas y tecnológicas

Las propiedades fisicoquímicas analizadas fueron: el pH, el color y la textura. El pH se determinó directamente sobre las muestras mediante un método potenciométrico utilizando un pHmetro portátil

con punzón especial para productos cárnicos. El color se midió con un colorímetro portátil en diferentes puntos de las hamburguesas por las dos caras, obteniendo los valores L*, a*, b* del espacio CieL*a*b*.

Los parámetros de textura se midieron sobre cubos de 1x1x1 cm de las hamburguesas cocinadas en el texturómetro, siguiendo el método del análisis de perfiles de textura TPA (Bourne, 1978). Entre los parámetros analizados se encuentran: dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad y resiliencia.

En cuanto a las propiedades tecnológicas analizadas se encuentran: los rendimientos de cocción, la capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad de retención de aceite (CRO). Para evaluar los rendimientos de cocción se calculó el tanto porcentual (%) de variación entre las hamburguesas crudas y cocinadas del peso y el tamaño. La cocción se llevó a cabo hasta que el interior de la carne alcanzaba 70ºC. La CRA y la CRO durante el cocinado se obtiene utilizando las Ecuaciones (4) y (5):

$$CRA(\%\ retención\ de\ agua) = \frac{masa\ (hamb.cocinada)^*\ \%\ humedad\ (cocida)}{masa(hamb.\ cruda)^*\ \%\ humedad\ (cruda)} \quad (4)$$

$$CRO(\%\ retención\ de\ aceite) = \frac{masa\ (hamb.cocinada)^*\ \%\ grasa\ (cocida)}{masa(hamb.\ cruda)^*\ \%\ grasa\ (cruda)} \quad (5)$$

Oxidación lipídica

Por último, la oxidación de lípidos se determinó siguiendo el ensayo de TBA (Rosmini et al, 1996), que cuantifica el malonaldehído (MDA), el producto secundario mayoritario en la oxidación de lípidos a través de colorimetría. Este ensayo se realizó tanto en las muestras crudas como en cocinadas, además de los días 0, 30 y 60 tras almacenamiento en condiciones de congelación.

Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo por un panel compuesto por 10 jueces miembros del departamento de investigación, con experiencia en análisis sensorial. La cata se separó en dos fases, una de evaluación de las hamburguesas en crudo y otra con las hamburguesas cocinadas. Las muestras se sirvieron codificadas y en orden aleatorio. La escala utilizada era numérica, desde 0 a 8 (siendo estos los valores extremos) y tenían un significado para cada atributo estudiado. Sobre las hamburguesas en crudo, en la hoja de catas se preguntaba por el color (de extremadamente claro a extremadamente oscuro), la presencia de aromas rancios (desde imperceptible a extremadamente rancio), y el aspecto visual general (desde aspecto normal hasta aspecto extremadamente anormal). Sobre las hamburguesas tras el cocinado, en la hoja de catas se preguntaba por la jugosidad (desde extremadamente seca a extremadamente jugosa), la masticabilidad (desde extremadamente tierna a extremadamente correosa), la sensación grasa en boca (desde nada grasa a extremadamente untuosa), la granulosidad (desde fragmentos muy finos a fragmentos muy gruesos) y por último un valor general de aceptabilidad de cada una. Los resultados se analizaron estadísticamente y se realizó el promedio de las puntuaciones dadas por los jueces.

Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos experimentalmente fueron analizados por el programa estadístico IBM SPSS Statistics, realizando un análisis de medias mediante ANOVA unifactorial y multifactorial para determinar la significancia (p value < 0,05, confianza del 95%) de las posibles diferencias observadas entre las variables, y un test de Tukey para agrupar las diferencias significativas entre los lotes.

Resultados y discusión

Composición química de las hamburguesas reformuladas con GEs

Los resultados de la composición química de las muestras a día 0 se resumen en la Tabla 2. No existieron diferencias significativas entre los lotes para el contenido en humedad, cenizas y proteínas. En cambio, sí existían diferencias en cuanto al contenido en grasa.

Tabla 2. Composición química (g / 100g de muestra) de las hamburguesas reformuladas con GEs.

Componente	Control	S1-25	S1-50	S2-25	S2-50
Humedad	62,39±2,52^{a}	65,47±2,48^{a}	65,90±0,34^{a}	65,08±0,89^{a}	65,72±0,64^{a}
Cenizas	2,33±0,20^{a}	2,24±0,20^{a}	2,38±0,03^{a}	2,22±0,02^{a}	2,27±0,04^{a}
Proteínas	17,47±1,78^{a}	19,63±0,36^{a}	18,06±0,04^{a}	18,43±0,28^{a}	17,50±1,41^{a}
Grasas	14,46±0,65^{a}	11,71±0,96^{b}	6,18±0,73^{c}	12,64±1,01^{ab}	9,91±0,49^{d}

Los resultados (promedio±desviación estándar) *con letra diferente en la misma fila muestran diferencias significativas para un grado de confianza del 95%, de acuerdo al Test de Tukey. Lotes analizados: Control (siguiendo la formulación tradicional), S1-25 (con sustitución de un 25% de la grasa por GE con harina de amaranto y aceite de chía), S1-50 (con sustitución de un 50% de la grasa por GE con harina de amaranto y aceite de chía), S2-25 (con sustitución de un 25% de la grasa por GE con harina de amaranto y aceite de cáñamo), S2-50 (con sustitución de un 25% de la grasa por GE con harina de amaranto y aceite de chía). GE = emulsión gelificada de aceite en agua.*

La sustitución directa de la grasa de cerdo por las GEs implica que, por cada gramo de grasa animal eliminada, se añade 0,4g de grasa vegetal en forma de emulsión, lo que se tradujo en una menor cantidad de grasa cuanto mayor es la sustitución, siendo el lote control el que mayor cantidad de grasa registró. En el lote S1-50 la reducción del contenido de grasa fue de más del 50% respecto al lote control. La disminución de grasa y el aumento en el contenido en cenizas son efectos que ya fueron anotados por otros estudios como el de Öztürk-Kerimoglu et al. (2021) sobre salchichas fermentadas sustituidas con GEs de aceites ricos en AGPI, o el de Nacak et al. (2021) que reformulaba salchichas con sustitución de grasas con GEs de aceite de cacahuete y de lino. Brítez et al. (2020) incorporó a snacks de carne harina de amaranto, encontrando diferencias significativas en el contenido de humedad (que aumentaba al incorporar GE con harina de amaranto) y en el contenido en cenizas, siendo mayor también. En el presente estudio, la proporción de la harina de amaranto fue menor que en el estudio citado, por lo que las diferencias que se observaron no fueron significativas en ninguno de los dos componentes, aunque sí se observó un mayor contenido en humedad en las hamburguesas sustituidas respecto a la formulación control. En el estudio de Glisic et al. (2018) sobre la sustitución de grasas en salchichas por GEs con inulina, el porcentaje de grasas disminuyó un 20% (sustitución del 16% por la emulsión gelificada con aceite de lino). Además, también aumentaron la humedad y las cenizas, mientras que en la cantidad de proteínas no hubo diferencias significativas. Resultados similares obtuvo Poyato et al. (2015) sustituyendo la grasa de cerdo de hamburguesas por GEs ricos en AGPI a diferentes porcentajes de sustitución. Al aplicar la emulsión a la formulación, se aumentó la cantidad de agua añadida, ya que por cada gramo sustituido de grasa, se añadió 0,4g de agua, lo que puede explicar el aumento de humedad.

Propiedades y efecto de la cocción

En la Tabla 3 se muestran los parámetros que se midieron para evaluar el efecto de la cocción sobre los diferentes lotes de hamburguesas producidos, analizando: las pérdidas de peso, la reducción del tamaño, el incremento de la altura o grosor de la hamburguesa, la capacidad de retener agua durante el cocinado y la capacidad de retener la grasa.

Tabla 3. Efecto de la cocción sobre las hamburguesas reformuladas con GEs.

	Control	S1-25	S1-50	S2-25	S2-50
Pérdida de peso (%)	19,34±0,30^{c}	21,63±0,47^{b}	24,26±0,56^{a}	27,13±0,32^{a}	25,09±0,95^{a}
Reducción de tamaño (%)	19,55±0,96^{a}	24,64±4,81^{a}	21,41±1,45^{a}	25,75±1,81^{a}	24,19±1,67^{a}
CRA (%)	61,03±4,10^{bc}	61,32±2,17^{bc}	65,10±2,63^{b}	45,78±4,11^{c}	90,33±1,49^{a}
CRO (%)	94,63±8,03^{a}	70,46±27,07^{a}	105,49±15,43^{a}	81,18±31,04^{a}	106,76±11,00^{a}

CRA = Capacidad de retención de agua, CRO = Capacidad de retención de grasa. Los resultados (promedio±desviación estándar) *con letra diferente en la misma fila muestran diferencias significativas para un grado de confianza del 95%, de acuerdo al Test de Tukey.*

Entre los lotes se pudo observar que no hubo diferencias significativas entre ellos en la reducción del tamaño. Por tanto, cabe resaltar que las hamburguesas reformuladas con GEs, presentaron el mismo comportamiento frente a la cocción con respecto a la reducción de tamaño. Las pérdidas de peso que se registraron fueron menores en la hamburguesa control, mientras que en el resto de lotes fue algo mayor, siendo significativamente diferentes las muestras S1-50 y las dos muestras S2 respecto al lote control y S1-25. La variabilidad en las medidas fue muy amplia, especialmente en el cálculo de la CRO en el que no se encontraron diferencias significativas. Investigaciones de Botella-Martinez et al. (2021) indicaron que la estabilidad de la emulsión gelificada en la matriz cárnica depende del tipo de harina utilizada, del tipo de aceite y de la proporción de la sustitución, siendo compleja su caracterización y exigiendo un estudio en profundidad del comportamiento de los geles emulsionados para encontrar las causas de las diferencias establecidas. El estudio de Pintado et al. (2018) sobre GEs de chía y avena como sustitutos de grasas en salchichas frescas indicó que las emulsiones eran estables al tratamiento térmico, siendo menores las pérdidas de grasa y agua en los lotes reformulados que en el control tradicional.

Los parámetros de textura que se analizaron (TPA) se reflejan en la Tabla 4. No se apreciaron diferencias significativas en los parámetros dureza, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad. En cambio, la cohesividad fue significativamente menor en las hamburguesas del lote S2-50. En este lote se apreció un tamaño de partícula mayor y con menor consistencia que el resto de lotes, lo que conlleva a esta disminución en su cohesividad.

Tabla 4. Efecto de la cocción sobre las propiedades de textura en las hamburguesas reformuladas con GEs.

	Control	S1-25	S1-50	S2-25	S2-50
Dureza	13,00±4,55^{a}	11,45±4,23^{a}	9,40±4,34^{a}	8,71±2,33^{a}	8,36±3,25^{a}
Adhesividad	-0,59±0,50^{a}	-0,27±0,26^{a}	-0,30±0,18^{a}	-0,36±0,33^{a}	-0,31±0,11^{a}
Elasticidad	0,23±0,08^{a}	0,22±0,02^{a}	0,18±0,04^{a}	0,21±0,03^{a}	0,26±0,04^{a}
Cohesividad	0,59±0,15^{ab}	0,50±0,11^{ab}	0,65±0,03^{a}	0,65±0,10^{a}	0,42±0,06^{b}
Gomosidad	7,81±4,12^{a}	5,96±3,44^{a}	5,98±3,50^{a}	5,60±1,59^{a}	3,69±1,94^{a}
Masticabilidad	1,69±0,77^{a}	1,39±0,91^{a}	1,15±0,79^{a}	1,16±0,37^{a}	1,02±0,65^{a}

*El parámetro dureza se mide en Newton (N) y la adhesividad en N*s. Los resultados (promedio*±desviación estándar) *con letra diferente en la misma fila muestran diferencias significativas para un grado de confianza del 95%, de acuerdo al Test de Tukey.*

Estudio de las propiedades fisicoquímicas y oxidación lipídica durante la conservación en congelación

En la Tabla 5 se recogen los resultados de las propiedades fisicoquímicas (pH y color) estudiadas durante la conservación en congelación. A día 0, el pH de cada muestra dependía tanto del tipo de

emulsión utilizada como del porcentaje de sustitución, siendo más ácido a mayor sustitución, reduciendo hasta 0,18 unidades la muestra S2-50 respecto a la muestra control.

Tabla 5. Efectos de la conservación en congelación sobre las propiedades fisicoquímicas en las hamburguesas reformuladas con Ges.

	Día	Control	S1-25	S1-50	S2-25	S2-50
pH	**0**	6,20±0,02^{a}	6,15±0,02^{b}	6,08±0,03^{c}	6,11±0,03^{bc}	6,02±0,03^{d}
	30	6,16±0,02	6,14±0,03	6,08±0,02	6,07±0,01	6,04±0,01
	60	6,17±0,02	6,14±0,01	6,05±0,03	6,07±0,01	6,02±0,03
L*	**0**	47,38±4,29^{a}	47,53±2,73^{a}	47,06±3,86^{a}	46,55±1,91^{a}	47,83±2,36^{a}
	30	46,61±8,29	46,90±4,36	44,32±3,19	42,89±3,15	45,29±2,97
	60	44,86±4,13	43,29±5,02	43,27±4,29	44,14±3,47	44,92±1,77
a*	**0**	4,06±1,40^{b}	5,72±1,23^{a}	5,10±1,27^{ab}	5,17±1,14^{ab}	4,36±0,73^{ab}
	30	4,82±2,84	4,64±1,04	5,07±1,35	7,15±1,70	4,99±1,63
	60	5,01±1,68	5,28±1,42	6,84±1,35	6,81±1,48	4,82±0,93
b*	**0**	7,76±1,87^{a}	9,08±1,87^{a}	8,69±1,41^{a}	8,95±1,21^{a}	9,41±1,40^{a}
	30	8,75±1,31	8,08±1,47	7,78±1,36	11,18±1,30	10,71±1,21
	60	7,57±1,46	8,44±0,95	8,40±0,99	11,44±1,83	10,09±1,74

L = Luminosidad de la muestra, a* = parámetro de color (negativo = verde, positivo = rojo), b* = parámetro de color (negativo = azul, positivo = amarillo). Los resultados (promedio*±desviación estándar*) con letra diferente en la misma fila muestran diferencias significativas para un grado de confianza del 95%, de acuerdo al Test de Tukey.*

Durante su conservación en congelación no existieron diferencias significativas entre los resultados obtenidos para cada lote en función del tiempo, siendo estables al menos durante 60 días de congelación. En los parámetros de color (L*, a* y b*) no existió ninguna diferencia significativa entre los lotes ni entre los días en los que se conservaron en congelación, siendo prácticamente idénticas que el control, lo que podría resultar en una mayor aceptación por parte del consumidor a la hora de comparar el producto en el mercado. Además, las hamburguesas resultaron estables cuando se almacenaron congeladas al menos durante 60 días, siendo interesante el estudio de su evolución a un mayor tiempo de almacenamiento.

La oxidación lipídica se evaluó para todos los lotes, cruda y cocida, durante 0, 30 y 60 días de ensayo (Figura 1). Los mayores valores de oxidación se registraron para la sustitución del GE de harina de amaranto con aceite de chía (S1).

En trabajos anteriores, Botella-Martínez et al. (2021) evaluaron la oxidación lipídica de diferentes GEs, siendo la de harina de amaranto con aceite de chía la que más vulnerabilidad ofreció frente a la oxidación lipídica con el paso del tiempo. En cambio, al igual que en estos resultados que se obtuvieron, la emulsión de harina de amaranto con aceite de cáñamo (S2) mostró una mayor resistencia a la oxidación lipídica. Esto podría deberse a mecanismos que previenen la oxidación derivados de sus compuestos antioxidantes. Sería necesaria una evaluación del potencial antioxidante del aceite de cáñamo en comparación con otros aceites, como en este caso el de chía, para su posible aplicación como ingrediente funcional por su efecto antioxidante, como ya evaluaron Férnandez-López et al. (2020) para la chía, la quinoa y sus subproductos.

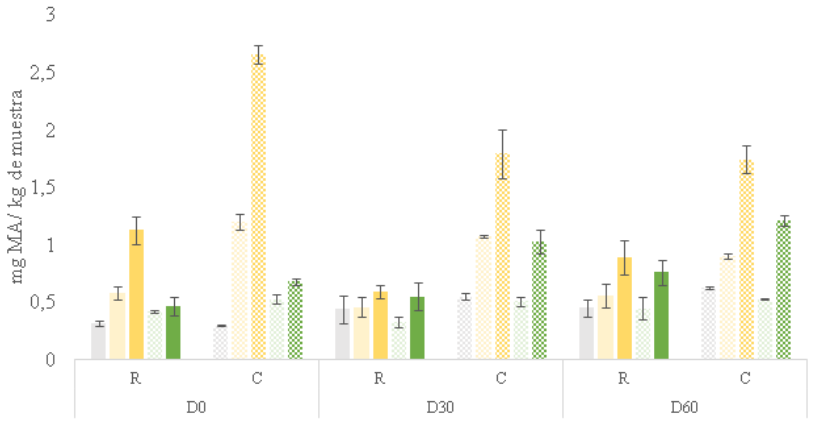


Figura 1. Resultados del ensayo TBA para la determinación de la oxidación lipídica. Leyenda de colores: Control (gris), S1-25 (naranja claro), S1-50 (naranja oscuro), S2-25 (verde claro) y S2-50 (verde oscuro). R = crudas, C = cocidas.

Análisis sensorial

En el análisis sensorial realizado por el panel de catas (Figura 2) se observó que los distintos parámetros de textura analizados como la gomosidad y la granulosidad se correlacionan con los obtenidos en el análisis de textura TPA, aunque la granulosidad de S2-50 fue evaluada como menor que en los demás lotes reformulados. La sensación grasa en boca fue mayor para los dos lotes sustituidos con aceite de chía (S1) (p<0,05), mientras que los de aceite de cáñamo obtuvieron resultados similares al control. La jugosidad fue mayor en la muestra control que en las reformuladas (p<0,05), que fueron puntuadas con un punto menos que la formulación control. Por último, la aceptabilidad fue mayor para la muestra control, seguida por la muestra S2-50, que en general obtuvo una baja puntuación en sensación grasa en boca y en gomosidad (p<0,05).

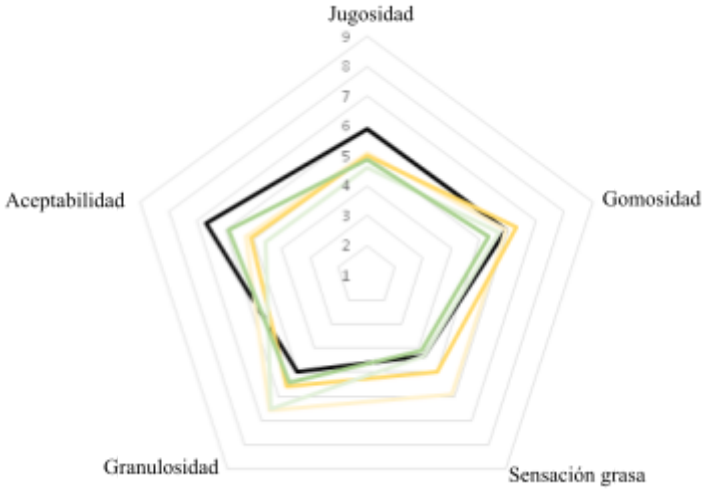


Figura 2. Resultados del análisis sensorial realizado por el panel de jueces. Control (negro), S1-25 (amarillo claro), S1-50 (amarillo oscuro), S2-25 (verde claro) y S2-50 (verde oscuro).

Conclusiones

Las hamburguesas reformuladas presentaron un menor contenido de grasa, respecto al control. Además, debido a la incorporación de aceites vegetales en GEs, se disminuyó el contenido en grasas animales en favor de los vegetales, que podría reflejar una mejora en el perfil lípido. Éstas también registraron un comportamiento de cocción similar para reducción de tamaño y CRO, mientras que sí afectó a la pérdida de peso y a CRA. Por lo que el tipo de aceite y el porcentaje de sustitución estaría afectando a la matriz cárnica. El aceite de cáñamo en las GEs, presentó propiedades protectoras frente a la oxidación de lípidos, ya que redujo la oxidación lipídica durante la congelación. Las hamburguesas con GEs de cáñamo (50 % sustitución) fueron las más aceptadas en el análisis sensorial tras la muestra control, siendo un aspecto a mejorar en otras reformulaciones.

Por último, durante la congelación fue una forma de conservación que mantuvo las propiedades fisicoquímicas estables en las hamburguesas con emulsión de aceite en agua (O/W) en función del tiempo.

Bibliografía

Abel, S., Riedel, S., & Gelderblom, W. C. A. (2014). Dietary PUFA and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, *73*(3), 361–367. https://doi.org/10.1017/s0029665114000585

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*, 18th ed.; AOAC: Washington, DC, USA, 2010.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). (2018). Plan de colaboración para la mejora de la composición de los alimentos y bebidas y otras medidas para 2020. Ministerio de Consumo. Madrid, 5 de febrero de 2018.

Bourne, M. C. (1978). Texture Profile Analysis. *Food Technology, 32*, 62-66, 72.

Botella-Martínez, C., Pérez-Álvarez, J. N., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2021). Assessment of Chemical, Physicochemical, and Lipid Stability Properties of Gelled Emulsions Elaborated with Different Oils Chia (Salvia hispanica L.) or Hemp (Cannabis sativa L.) and Pseudocereals. *Foods*, *10*(7), 1463. https://doi.org/10.3390/foods10071463

Bowen, K. J., Harris, W. S., & Kris-Etherton, P. M. (2016). Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Are There Benefits? *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, *18*(11). https://doi.org/10.1007/s11936-016-0487-1

Britez, M. G., Rolhaiser, F. A., Romero, A. M., & Romero, M. C. (2020). Incorporación de harina de amaranto para la obtención de bocaditos de carne con bajo contenido de grasa. *Enfoque UTE*, *11*(3), 35–45. https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v11n3.558

Carus, M., & Sarmento, L. (2016). The European Hemp Industry: Cultivation, processing and applications for fibres, shivs, seeds and flowers. *Journal of Industrial Hemp*, 1–9.

Ciftci, O. N., Przybylski, R., & Rudzińska, M. (2012). Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *114*(7), 794–800. https://doi.org/10.1002/ejlt.201100207

FECIC. (2020). *El sector en cifras*. Federación Empresarial de Carnes e Industrias Cárnicas. https://www.fecic.es/es/sector-cifras/index.htm

Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., Sayas-Barberá, M. E., Navarro-Rodríguez De Vera, C., Lucas-González, R., Roldán-Verdú, A., Botella-Martínez, C., & Pérez-Alvarez, J. A. (2020). Chia, Quinoa, and Their Coproducts as Potential Antioxidants for the Meat Industry. *Plants*, *9*(10), 1359. https://doi.org/10.3390/plants9101359

Freire, M., Cofrades, S., Pérez-Jiménez, J., Gómez-Estaca, J., Jiménez-Colmenero, F., & Bou, R. (2018). Emulsion gels containing n-3 fatty acids and condensed tannins designed as functional fat replacers. *Food Research International*, *113*, 465–473. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.041

Glisic, M., Baltic, M., Glisic, M., Trbovic, D., Jokanovic, M., Parunovic, N., Dimitrijevic, M., Suvajdzic, B., Boskovic, M., & Vasilev, D. (2018). Inulin-based emulsion-filled gel as a fat replacer in prebiotic- and PUFA-enriched dry fermented sausages. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(3), 787–797. https://doi.org/10.1111/ijfs.13996

Krebs, J. D., Browning, L. M., McLean, N. K., Rothwell, J. L., Mishra, G. D., Moore, C. S., & Jebb, S. A. (2006). Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *International Journal of Obesity*, *30*(10), 1535–1544. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803309

López, D. N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., & Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food Research International*, *116*, 419–429. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.056

Nacak, B., Öztürk-Kerimoğlu, B., Yıldız, D., ÇAğındı, Z., & Serdaroğlu, M. (2021). Peanut and linseed oil emulsion gels as potential fat replacer in emulsified sausages. *Meat Science*, *176*, 108464. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108464

Öztürk-Kerimoğlu, B., Kavuşan, H. S., Benzer Gürel, D., ÇAğındı, Z., & Serdaroğlu, M. (2021). Cold-set or hot-set emulsion gels consisted of a healthy oil blend to replace beef fat in heat-treated fermented sausages. *Meat Science*, *176*, 108461. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108461

Ozturk-Kerimoglu, B., Serpil Kavusan, H., Mulazimoglu, Y., Aksehirli, B., Aygun, A., & Serdaroglu, M. (2019). A novel fat modification strategy in fermented sausages by incorporation of gelled emulsions with fig seed oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *333*, 012090. https://doi.org/10.1088/1755-1315/333/1/012090

Pintado, T., Herrero, A., Jiménez-Colmenero, F., Pasqualin Cavalheiro, C., & Ruiz-Capillas, C. (2018). Chia and oat emulsion gels as new animal fat replacers and healthy bioactive sources in fresh sausage formulation. *Meat Science*, *135*, 6–13. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.08.004

Pintado, T., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Carmona, P., & Herrero, A. (2015). Oil-in-water emulsion gels stabilized with chia (Salvia hispanica L.) and cold gelling agents: Technological and infrared spectroscopic characterization. *Food Chemistry*, *185*, 470–478. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.024

Pourashouri, P., Shabanpour, B., Kordjazi, M., & Jamshidi, A. (2020). Characteristic and shelf life of fish sausage: fortification with fish oil through emulsion and gelled emulsion incorporated with green tea extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(12), 4474–4482. https://doi.org/10.1002/jsfa.10488

Poyato, C., Astiasarán, I., Barriuso, B., & Ansorena, D. (2015). A new polyunsaturated gelled emulsion as replacer of pork back-fat in burger patties: Effect on lipid composition, oxidative stability and sensory acceptability. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(2), 1069–1075. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.004

Rosmini, M., Perlo, F., Pérez-Alvarez, J., Pagán-Moreno, M., Gago-Gago, A., López-Santoveña, F., & Aranda-Catalá, V. (1996). TBA test by an extractive method applied to 'paté'. *Meat Science*, *42*(1), 103–110. https://doi.org/10.1016/0309-1740(95)00010-0

Shan, L. C., de Brún, A., Henchion, M., Li, C., Murrin, C., Wall, P. G., & Monahan, F. J. (2017). Consumer evaluations of processed meat products reformulated to be healthier – A conjoint analysis study. *Meat Science*, *131*, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.239

Singh, N., Singh, P., Shevkani, K., & Virdi, A. S. (2019). Amaranth: Potential Source for Flour Enrichment. *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*, 123–135. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814639-2.00010-1

Zając, M., Guzik, P., Kulawik, P., Tkaczewska, J., Florkiewicz, A., & Migdał, W. (2019). The quality of pork loaves with the addition of hemp seeds, de-hulled hemp seeds, hemp protein and hemp flour. *LWT*, *105*, 190–199. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.013

Zhu, F. (2020). Dietary fiber polysaccharides of amaranth, buckwheat and quinoa grains: A review of chemical structure, biological functions and food uses. *Carbohydrate Polymers*, *248*, 116819. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116819

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Aplicación de subproducto de mango como antioxidante en un producto cárnico

L. Morocho, J.F. Reyes y M.C. Guamán-Balcázar

[1] Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja, 110150, Loja, Ecuador, e-mail: lnmorocho1@utpl.edu.ec

Resumen

La industria alimentaria genera una gran cantidad de desechos orgánicos, los cuales, al no ser tratados adecuadamente pueden ser un problema medioambiental debido a su descomposición, sin embargo, un buen tratamiento puede ser de gran ayuda en la economía de los agricultores e industrias. En el caso de la industrialización del mango se tiene como desechos un 32% del total de la fruta.

Varios estudios realizados sobre la calidad nutricional destacan la alta capacidad antioxidante del epicarpio de mango, considerándola como un posible antioxidante de origen natural, con lo cual, este subproducto podría ser utilizado en matrices alimentarias con alto porcentaje de grasa cuya oxidación lipídica se da inevitablemente, en este sentido la presente investigación tiene por objetivo determinar la efectividad de los antioxidantes de subproducto de mango para evitar la oxidación de grasas en productos cárnicos como mortadela, para lo cual se utilizó la harina del epicarpio de mango, producto atomizado de cáscara de mango y antioxidantes sintéticos y comerciales como eritorbato de sodio y α - tocoferol.

Para la obtención de la materia prima, se realizó el despulpado de la fruta de mango, seguidamente una deshidratación de la piel por 14 horas a 55 °C y molienda hasta obtener un tamaño de partícula similar al de una harina. Así mismo, se efectúa la extracción de antioxidantes del subproducto utilizando como solvente etanol - agua (50:50 v/v), seguidamente se ejecutó el proceso de atomización, utilizando maltodextrina como agente encapsulante. En lo referente a la elaboración de la mortadela se utilizaron 0.5% y 1% de subproducto molido y atomizado respectivamente, y dos antioxidantes comerciales como eritorbato de sodio y α - tocoferol. Para la medición de la oxidación lipídica se utilizó el método Tbars que mide el malondialdehído (MDA) formado como producto principal de la degradación de hidroperóxidos generados por la oxidación de lípidos, esta medición se expresa en mg MDA/Kg de muestra como unidades de medida en la determinación del índice de oxidación, para la medición de color se utilizó el colorímetro marca C-R14 Konica Minolta, y para medir el pH se utilizó un pH-metro digital marca Mettler Toledo. Estas mediciones se realizaron desde el día 1 hasta el día 28, en periodos de 7 días.

Con la incorporación del antioxidante natural en la formulación de la mortadela, se observan cambios de textura, cuando se aplican cantidades mayores al 1% de producto atomizado, dicha textura es blanda y arenosa al momento de consumirla, este defecto es atribuible a una rotura de emulsión causada por la disminución del pH. Con respecto a los resultados de la oxidación lipídica, el grado de oxidación fue menor al comparar con el eritorbato de sodio a las muestras que contienen en su formulación el 0.5 y 1% de la harina de piel de mango y el extracto atomizado sin embargo, el tratamiento que tuvo mayor aceptación fue el del 1% de producto atomizado ya que para el día 28 el cambio en los valores del índice de oxidación es mínimo, en relación al uso del α - tocoferol, comparado con las muestras que contienen la harina y extracto atomizado, respectivamente se determina que la acción del antioxidante natural es muy similar con los antioxidantes sintéticos , no obstante, el 1% de la harina de piel de mango es la que tiene valores casi similares al determinar el índice de oxidación para el día 28.

En lo referente al pH, se obtuvo una leve disminución de este valor desde 5.95 (día 1) a 5.69 (día 28) en la muestra que contienen en su formulación 1% de extracto atomizado, mientras que al utilizar eritorbato de sodio se obtiene un valor de 6,60 para el día 28. Con respecto al color, no hubo cambio significativo desde el día 1 al 28 en todas las muestras, sin embargo, al utilizar harina de piel de mango y 1 % atomizado el color del embutido difiere al ser comparado con el antioxidante sintético. Con los resultados obtenidos se demuestra que el subproducto de mango inhibe la oxidación de grasas, por lo que podría ser utilizado como conservante natural.

Palabras clave: Antioxidante natural, subproducto de mango, embutido, método TBARs.

Application of mango by-product as an antioxidant in a meat product

Abstract

The food industry generates a large amount of organic waste, which, if not properly treated, can be an environmental problem due to its decomposition; however, a good treatment can be of great help in the economy of farmers and industries. In the case of mango industrialization, 32% of the total fruit is considered as waste.

Several studies carried out on the nutritional quality highlight the high antioxidant capacity of mango epicarp, considering it as a possible antioxidant of natural origin, with which, this by-product could be used in food matrices with high percentage of fat whose lipid oxidation inevitably occurs, In this sense, the objective of this research is to determine the effectiveness of mango by-product antioxidants to prevent fat oxidation in meat products such as mortadella, for which mango epicarp flour, atomized mango peel product and synthetic and commercial antioxidants such as sodium erythorbate and tocopherol were used.

To obtain the raw material, the mango fruit was pulped, followed by dehydration of the skin for 14 hours at 55 °C and grinding until a particle size similar to that of a flour was obtained. Likewise, the extraction of antioxidants from the by-product was carried out using ethanol-water (50:50 v/v) as a solvent, followed by the atomization process, using maltodextrin as an encapsulating agent. For the preparation of mortadella, 0.5% and 1% of ground and atomized by-product, respectively, and two commercial antioxidants, sodium erythorbate and tocopherol, were used. For the measurement of lipid oxidation, the Tbars method was used, which measures the malondialdehyde (MDA) formed as the main product of the degradation of hydroperoxides generated by lipid oxidation; this measurement is expressed in mg MDA/Kg of sample as units of measurement in the determination of the oxidation index; for the measurement of color, the C-R14 Konica Minolta colorimeter was used, and a Mettler Toledo digital pH meter was used to measure pH. These measurements were taken from day 1 to day 28, in 7-day periods.

With the incorporation of the natural antioxidant in the mortadella formulation, changes in texture were observed, when quantities greater than 1% of atomized product were applied; this texture is soft and sandy now of consumption; this defect is attributable to an emulsion breakage caused by the decrease in pH. With respect to the results of lipid oxidation, the degree of oxidation was lower when compared with sodium erythorbate in the samples containing 0.5 and 1% of skin flour in their formulation. 5 and 1% of the mango skin flour and the atomized extract, however, the treatment that had greater acceptance was the 1% of atomized product, since for day 28 the change in the values of the oxidation index is minimal, in relation to the use of tocopherol, compared with the samples containing the flour and atomized extract, respectively, it is determined that the action of the natural antioxidant is very similar to the synthetic antioxidants, however, 1% of the mango skin flour is the one that has almost similar values when determining the oxidation index for day 28.

Regarding pH, a slight decrease in this value was obtained from 5.95 (day 1) to 5.69 (day 28) in the sample containing in its formulation 1% of atomized extract, while when using sodium erythorbate a value of 6.60 was obtained for day 28. With respect to color, there was no significant change from day 1 to day 28 in all samples; however, when using mango skin flour and 1% atomized extract, the color of the sausage differs when compared with the synthetic antioxidant. The results obtained show that the mango by-product inhibits the oxidation of fats, so it could be used as a natural preservative.

Keywords: Natural antioxidant, mango by-product, sausage, TBARs method.

Introducción y/o Justificación

En la actualidad, la producción e industrialización de una gran variedad de frutas genera grandes cantidades de residuos orgánicos, que al no ser tratados adecuadamente resultan siendo contaminantes para el medio ambiente. De acuerdo con la investigación de Vera L et al., (2017) los residuos sólidos representan el 71% de los residuos urbanos, lo que significa una producción de 5298 ton/día en el Ecuador. En el caso del procesamiento industrial del mango (Mangifera indica), los principales subproductos son la cáscara y el hueso. Estos residuos son considerados como fuente importante de compuestos bioactivos, tales como la pectina, polifenoles y manguiferina presente en la cáscara, y compuestos de naturaleza fenólica con actividad antioxidante y antiinflamatoria (Jibaja E, 2014), estos componentes son de gran ayuda para el desarrollo de productos con un alto valor nutricional y funcional.

Como resultado del conocimiento de estos componentes en referencia a los residuos se han realizado varios estudios en los cuales se aprovecha cada componente para el desarrollo y mejora de productos cárnicos, aprovechando la capacidad antioxidante que tiene la cáscara de mango.

Para la preservación de las características organolépticas y vida útil de un producto cárnico, en este caso una mortadela, se utilizan antioxidantes para evitar la oxidación lipídica, derivado de la composición de los ácidos grasos, factores de procesamiento, concentración y tipo de oxígeno, metales de transición, peróxidos, compuestos térmicamente oxidados, pigmentos y antioxidantes, así lo menciona en su publicación de Lorena I et al., (2013) consultada de Choe y Min, (2006). El uso de antioxidantes naturales ayuda a dar un valor agregado al residuo y además es óptimo, debido a la tendencia del consumo de alimentos sin aditivos sintéticos.

El uso de aditivos sintéticos es limitado a determinadas cantidades y presenta fácil volatilidad al someterlos a temperaturas altas, además que tienen un gran cuestionamiento en relación con la seguridad alimentaria ya que varias investigaciones han comprobado su efecto tóxico, sin embargo, el uso de antioxidantes de origen natural se ha extendido debido a la preservación de la salud del consumidor al momento de formular y procesar el alimento (Armenteros et al., 2012).

Cabe recalcar que la eficacia antioxidante depende de la polaridad del medio, temperatura, tipo de sustrato, condiciones de la oxidación y estado físico (sólido, líquido o emulsión), (Lorena I et al., 2013), por lo cual se debe tomar en cuenta para la formulación de la mortadela.

Por lo antes expuesto, en la presente investigación se pretende medir la oxidación de los lípidos en la mortadela cuya formulación varía al utilizar antioxidantes artificiales y el uso de antioxidante obtenido a partir de subproducto de mango, cada uno en diferente proporción en cada muestra.

Material y Métodos

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó como materia prima la piel de mango de la variedad Tommy Atkins, al ingresar la materia prima se realiza los siguientes análisis: Aw, color, pH, °Brix, acidez e índice de madurez. Luego de haber realizado estos análisis se procede a la limpieza y desinfección de la fruta utilizando 80 ppm/L de hipoclorito, el cual se deja actuar por 3 min, pasado el tiempo se procede al escaldado de la fruta a 92°C por 3 minutos, con la finalidad de facilitar la extracción de la cáscara. Las cáscaras extraídas se cortan en julianas y se las coloca en las bandejas del deshidratador lassele Dy-110H, se deshidratan a una temperatura de 55°C por 14 h, una vez cumplido el tiempo se procede a molerlas con un molino eléctrico de marca Corona, se utiliza también un molino ultracentrífugo ZM 200, RTSCH, Alemania, en este molino se utiliza una velocidad de 16000 rpm, utilizando una malla 0.75. Al finalizar el proceso de molido se separa las partículas utilizando un tamizador de la marca Humbolt para obtener un tamaño de partícula de 250 µm.

La obtención de los extractos de subproducto se sigue la metodología descrita por Paucar A, (2018), la cual utiliza como solvente etanol-agua 50/50, para la extracción utiliza 25g de subproducto con adición de 500 ml de solvente, se coloca en baño maría con agitación a 60°C durante 1h con 30 min. Se filtra utilizando vacío y el extracto líquido se roto evapora a una temperatura de 45 °C con una presión de 305 mbar.

En la obtención de polvos atomizados se sigue la metodología descrita por Paucar A, (2018) la cual utiliza el atomizador mini spray (BUCHI B-290), la cual utiliza las siguientes condiciones: 155°C y 20% de flujo de la bomba.

En la determinación de las características físicas y químicas de la materia prima se utilizó para el color un colorímetro digital de marca CR-14 Konical Minolta, un pH metro digital 30 PX de punción marca Mettler Toledo, para la determinación de acidez se realizó por el método de titulación utilizando NaOH al 0,1 N, la Aw se midió utilizando el equipo marca Novasina modelo NV2600179.

Para la elaboración de las muestras de mortadela se utilizó la formulación establecida en el estudio de Ovaco V, (2019), misma que se presenta en la Tabla 1:

Tabla 1. Formulación para la elaboración de mortadela

Carne magra de cerdo	50%
Carne magra de res	25%
Grasa dorsal de cerdo	25%
Hielo	15%
Sal	2,5%
Almidón	3%
Polifosfato	300 mg/Kg
Nitrito de sodio	200 mg/Kg
Condimentos	0,35%

Nota: Como condimentos se utilizó el denominado SABORA de la empresa ILE de la ciudad de Loja, la grasa que se utiliza deberá estar congelada para molerla y cuterar.

Para el presente trabajo se utilizaron tratamientos que contienen antioxidantes naturales y sintéticos, los mismos están presentados en la tabla 2:

Tabla 2. Tratamientos en mortadela con antioxidante natural y sintéticos.

Tratamientos	**Concentración** (%)
Blanco (sin antioxidante)	0
Eritorbato de sodio	0,05
α - tocoferol	1
Subproducto	0,5
Subproducto	1
Atomizado	0,5
Atomizado	1

Nota: Los tratamientos se realizaron por duplicado.

En lo que respecta a la medición de la peroxidación lipídica de la mortadela se realizó utilizando el método TBA por destilación, este método consiste en pesar 10 g de muestra y homogenizarlo con 97,5 mL agua destilada, la homogenización se realizó en el equipo ultraturrax a una velocidad de 2500 rpm.

Se adiciona 2,5 mL de HCl 4 N y se destila, del producto destilado se recoge 50 mL con una probeta. De los 50 mL se toma una alícuota de 5 mL y se coloca en un tubo de centrífuga con 5 mL de reactivo de TBA, se agita y coloca en el baño maría a 85 °C por 40 min, se enfría y se mide la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro de celdas.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en la tabla 3, son similares al estudio realizado por Quintero et al., (2013) y Palmar et al., (2016) de frutos de mango de la variedad Tommy Atkins, además se compara el índice de madurez de la fruta que se tiene con la obtenida por Mahecha et al., (1991) el mismo que tiene un valor similar, sintetizando, los valores se encuentran en valores cercaos a los relacionado con bibliografía y por ende se considera como óptimo para el consumo.

Tabla 3. Caracterización de la materia prima.

Análisis	Cáscara de mango	Pulpa de mango	Referencia *
Aw	0,978	0,975	0,989[a]
°Brix	4,73	13,27	16,33[b]
pH	4,65	4,28	4,15[b]
Acidez titulable (ácido cítrico)	-	0,40	0,41[b]
Índice de madurez	-	37,01	38,00[c]

Nota: Adaptado de aQuintero et al. (2013), bPalmar et al. (2016) y cMahecha et al., (1991).

En la tabla 4 se presentan los valores obtenidos en la determinación de malonaldehido (mg MDA/Kg de mortadela) en la mortadela, para los 7 tratamientos realizados.

Tabla 4. Resultados de la determinación de malondialdehido mg MDA/Kg de carne en mortadela.

Tratamientos	Día 1	Día 7	Día 14	Día 28
Blanco (Sin antioxidante)	$0{,}0438^{Aa} \pm 0{,}00$	$0{,}1760^{Ab} \pm 0{,}01$	$0{,}1989^{Ac} \pm 0{,}01$	$0{,}5128^{Ad} \pm 0{,}01$
Eritorbato de sodio 0,05%	$0{,}0073^{Ba} \pm 0{,}00$	$0{,}0438^{Bb} \pm 0{,}00$	$0{,}1943^{Bc} \pm 0{,}01$	$0{,}4310^{Bd} \pm 0{,}01$
α - tocoferol 1%	$0{,}0073^{Ba} \pm 0{,}00$	$0{,}0620^{Cb} \pm 0{,}00$	$0{,}1852^{Bc} \pm 0{,}01$	$0{,}1984^{Cc} \pm 0{,}00$
Subproducto 0.5%	$0{,}0073^{Ba} \pm 0{,}00$	$0{,}0620^{Cb} \pm 0{,}00$	$0{,}1850^{Bc} \pm 0{,}01$	$0{,}1893^{Dc} \pm 0{,}00$
Subproducto 1%	$0{,}0347^{Ca} \pm 0{,}00$	$0{,}0346^{Ba} \pm 0{,}00$	$0{,}2027^{Ab} \pm 0{,}01$	$0{,}2164^{Fb} \pm 0{,}00$
Atomizado 0.5%	$0{,}0529^{Aa} \pm 0{,}00$	$0{,}0756^{Db} \pm 0{,}01$	$0{,}2760^{Cc} \pm 0{,}01$	$0{,}2756^{Gc} \pm 0{,}01$
Atomizado 1%	$0{,}0073^{Ba} \pm 0{,}00$	$0{,}0711^{Db} \pm 0{,}00$	$0{,}1939^{Bc} \pm 0{,}01$	$0{,}2170^{Fc} \pm 0{,}00$

Nota: Los valores corresponden a la desviación estándar ± de 2 repeticiones. Las letras mayúsculas diferentes colocadas como superíndices en cada fila representan diferencia significativa (p<0.05) para cada tratamiento, las letras minúsculas diferentes colocadas como superíndices en cada columna representan la diferencia significativa (p<0.05) entre los días.

En la tabla 4 se observa que no hay diferencia significativa en los valores del día 1 para los tratamientos con Eritorbato de sodio, α - tocoferol, subproducto 0,5% y atomizado 1%, estos valores son bajos en relación con el blanco, subproducto 1% y atomizado 0,5%. Al comparar los valores del día 1 y 28 se observa que hay diferencia significativa durante el almacenamiento, es decir, la cantidad de malondialdehido (MDA) aumenta, sin embargo, para el día 28 los tratamientos que contienen mayor cantidad de MDA con respecto a los demás tratamientos.

El tratamiento que contiene 0,5% de subproducto tienen acción inhibitoria igual al tratamiento que contiene 1% de α - tocoferol, en cambio, con los tratamientos que contienen 1% de subproducto, 0,5% y 1% de atomizado los valores son similares, previenen la oxidación lipídica de las muestras, sin

embargo, de estos tres tratamientos el 0,5% atomizado tienen un valor más alto a los demás tratamientos con antioxidante natural pudo actuar como prooxidante, debido a la cocción, ya que la alteración del tejido interrumpe la organización celular y favorece la alteración entre prooxidantes y ácidos grasos insaturados lo que provocaría un aumento en el valor de MDA, así lo explica en su trabajo Zafra C, (2021), por otro lado en los días 14 y 28 no hay diferencia significativa entre los valores, exceptuando los tratamientos blanco y eritorbato de sodio, ya que pasan de valores de 0,14 mg MDA/Kg de mortadela a 0,51 y 0,43 mg MDA/kg de mortadela respectivamente.

Al comparar los resultados con estudios realizados, se encontró que, en el estudio realizado por Pereira et al., (2011), al utilizar extracto de mango con 0,1 y 0,2% en la formulación de mortadela para el día 28 se obtiene valores de 0.34 mg MDA/Kg de mortadela, en un estudio realizado por Lazzari, (2017), el cual utiliza maca peruana (Lepidium meyenii) como antioxidante natural obtiene en el día 30 un valor de MDA de 1.50 mg MDA/Kg de mortadela, al utilizar un 5% como concentración de mortadela.

Por su parte Baldin, (2016) utiliza extracto de jabuticaba (Myrciaria cauliflora) en concentraciones de 2 y 4% como antioxidante lipídico en sus muestras de mortadela y en el día 26 obtiene un valor de 0,8 mg MDA/Kg de mortadela.

En la tabla 5 se observan los valores obtenidos en la determinación de pH de los tratamientos realizados, de los cuales se puede destacar que hay una variación en los valores de pH desde el día 1 al día 28, como en el caso del blanco, Eritorbato de sodio, α - tocoferol y 0,5% de subproducto el pH aumenta, a diferencia de los tratamientos que contienen 1% de subproducto y 1% de atomizado, estos valores disminuyen desde el día 1 al día 7, que al ser comparados con la norma NTE INEN 1340:1996, estos valores se encuentran fuera del rango de aceptación.

Tabla 5. Resultados de la determinación de pH en la mortadela.

Tratamientos	Día 1	Día 7	Día 14	Día 28
Blanco (Sin antioxidante)	$5,94^{Aa}$ ±0,01	$5,87^{Ab}$ ± 0,04	$5,87^{Ab}$ ± 0,01	$6,12^{Ac}$ ± 0,00
Eritorbato de sodio 0,05%	$6,01^{Ba}$ ± 0,01	$5,86^{Ab}$ ± 0,11	$5,86^{Bb}$ ± 0,00	$6,60^{Bc}$ ± 0,01
α - tocoferol 1%	$6,03^{Ca}$ ± 0,01	$5,97^{Cb}$ ± 0,02	$5,97^{Cc}$ ± 0,01	$6,61^{Bd}$ ± 0,01
Subproducto 0.5%	$5,99^{Ba}$ ± 0,05	$6,01^{Bb}$ ± 0,04	$6,01^{Db}$± 0,01	$6,09^{Ad}$ ± 0,01
Subproducto 1%	$6,05^{Ca}$ ± 0,00	$5,92^{Db}$ ± 0,06	$5,92^{Cb}$ ± 0,01	$5,67^{Cd}$ ± 0,01
Atomizado 0.5%	$5,88^{Da}$ ± 0,02	$5,97^{Cb}$ ± 0,06	$5,97^{Db}$ ± 0,02	$5,74^{Dc}$ ± 0,01
Atomizado 1%	$5,95^{Aa}$ ± 0,01	$5,81^{Eb}$ ± 0,05	$5,81^{Db}$ ± 0,01	$5,69^{Cc}$ ± 0,01

Nota: Los valores corresponden a la desviación estándar ± de 2 repeticiones. Las letras mayúsculas diferentes colocadas como superíndices en cada fila representan diferencia significativa (p<0.05) para cada tratamiento, las letras minúsculas diferentes colocadas como superíndices en cada columna representan la diferencia significativa (p<0.05) entre los días.

En lo referente a la mortadela que contienen 0,5% de subproducto, al consultar con la bibliografía, de acuerdo con los requisitos de la norma NTE INEN 1340:1996, referente al almacenamiento de la mortadela, los valores de pH no decrecen durante el tiempo de almacenamiento, como es el caso en el estudio realizado por Pereira et al., (2011), sin embargo, en los estudios realizados por Baldin, (2016) y Lazzari, (2017) respectivamente los valores de pH decrecen durante el almacenamiento, en el caso de Lazzari, (2017) menciona que se debe a la fermentación de la maca, en el caso de Baldin, (2016) se debe a presencia de carbohidratos presentes en la formulación los cuales forman ácido láctico durante el tiempo de almacenamiento.

En la tabla 6 se observa el cambio de color que se da en cada uno de los tratamientos, donde se puede visualizar un ligero cambio en el tratamiento con α - tocoferol, este cambio se da en el día 14, ya que el color se torna con una tonalidad más fuerte, sin embargo, este color disminuye para el día 28, esto puede deberse a la formación de nitrosometamioglobina por presencia de oxígeno en la matriz de la emulsión al ser embutida y posteriormente sometida a un tratamiento de calor.

Tabla 6. Resultados obtenidos del color de la mortadela durante su almacenamiento.

Tratamientos	Almacenamiento			
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 28
Blanco (sin antioxidante)				
Eritorbato de sodio 0,05%				
α - tocoferol 1%				
Subproducto 0,5%				
Subproducto 1%				
Atomizado 0,5%				
Atomizado 1%				

Conclusiones

Se elaboró mortadela con 7 tratamientos utilizando el 0,5% y subproducto 1% (cáscara de mango) y atomizado 0,5% y 1%, frente a una muestra sin antioxidante y un control con eritorbato y α - tocoferol, el subproducto y atomizado presentaron actividad antioxidante al inhibir la oxidación lipídica durante los 28 días de almacenamiento de mortadela.

El producto atomizado y subproducto de cáscara de mango de concentración de 0,5% y 1% respectivamente inhibieron la oxidación lipídica en las muestras de mortadela durante los 28 días de almacenamiento, sin embargo, la concentración de 0,5% de subproducto tiene mayor capacidad antioxidante en comparación con el eritorbato de sodio, subproducto 0,5% tiene la capacidad de inhibición de oxidación de lípidos similar al α-tocoferol, por ende, se puede reemplazar el antioxidante sintético por el subproducto de mango.

Agradecimientos

Agradecemos a la red HealthyMeat, financiada por CYTED (ref. 119RT0568) por el asesoramiento y al Laboratorio de Alimentos de la UTPL por los análisis.

Bibliografía

Armenteros, M., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, J. (2012). Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. Eurocarne, 207, 63–73. https://eurocarne.com/daal/a1/boletin_imagenes/a2/20705.pdf

Baldin, J. C. (2016). Avaliação do potencial antimicrobiano e antioxidante do extrato de jabuticaba (Myrciaria cauliflora) microencapsulado adicionado em linguiça frescal e mortadela [Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo]. https://doi.org/10.11606/T.74.2016.TDE-03052016-082922

Jibaja E, L. M. (2014). Determinación de la capacidad antioxidante y análisis composicional de harina de cáscara de mango, Mangífera indica, variedad "Criollo." Cientifi-k., 2(1), 62–69. http://revistas.ucv.edu.pe/index.php/CIENTIFI-K/article/view/290/182

Lazzari, A. (2017). Avaliação da influência da maca peruana (Lepidium meyenii) em mortadela [Universidade Tecnológica Federal do Paraná]. http://repositorio.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/6686

Lorena I, Y., Restrepo M, D., & López V, J. (2013). Oxidación lipídica y antioxidantes naturales en derivados cárnicos 1. J. Eng. Technol, 2(2), 50–66.

Mahecha, G., de Civetta, L. A., & Rodríguez, C. (1991). Normas de calidad para las variedades de mango "Tommy Atkins" y "Común" (Hilacha). 20(2).

NTE INEN 1340. (1996). Carne y productos cárnicos. Mortadela. Requisitos. http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/149/3/03 AGP 63 NTE INEN 1340.pdf

Ovaco V, L. Y. (2019). Antioxidantes de subproductos de mango para la aplicación en la industria de alimentos.

Palmar, V. F., Hernández V, J. D., & Rodríguez, B. S. (2016, May 19). Caracterización físico-química y actividad antioxidante de frutos de mango (Mangifera indica cv. Tommy Atkins. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 216–231. https://www.produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/27199/27821

Paucar A, C. Y. (2018). Microencapsulamiento para la obtención de polvo a partir del subproducto de mango (Mangifera indica).

Pereira, A. L. F., Vidal, T. F., Teixeira, M. C., Oliveira, P. F. de, Pompeu, R. C. F. F., Vieira, M. M. M., & Zapata, J. F. F. (2011). Antioxidant effect of mango seed extract and butylated hydroxytoluene in bologna-type mortadella during storage. Food Science and Technology, 31(1), 135–140. https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100019

Quintero, V. C., Giraldo, G. G., Lucas, J. A., & Vasco, J. L. (2013). Caracterización físico química del mango común (Mangifera índica L.) durante su proceso de maduración. Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial, 11(1), 8–18. https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/287

Vera L, J., Anchundia V, G., & Sccipa M, M. (2017). Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos de las frutas mediante digestión anaerobia. REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA ARBITRADA YACHASUN - ISSN: 2697-3456, 1(1), 32–42. https://doi.org/10.46296/YC.V1I1.0005

Zafra C, D. I. (2021). Uso de extractos de cáscara de mango (mangifera indica l.) como aditivo natural multifuncional sobre un producto cárnico con dos diferentes formas de procesamiento [Universidad Tecnológica de la Mixteca]. http://repositorio.utm.mx:8080/jspui/handle/123456789/362

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Caracterización de queso curado de oveja con y sin DOP Manchego basado en el perfil de compuestos volátiles, pH, humedad y ATR-FTIR

R. Pesci de Almeida [1], K. A. Igler [2], M. Cano-Lamadrid [2], E. Sendra [2], A. Beltrán [1] y A. Valdés [1]

[1] Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Carretera San Vicente del Raspeig s/n, Universidad de Alicante, 03690, San Vicente del Raspeig. rpda2@alu.ua.es
[2] Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra de Beniel km 3,2. Orihuela, Alicante. 03312.

Resumen

Los productos de calidad diferenciada, propios de la tradición y cultura española, se encuentran regulados por sellos de calidad, entre los que destaca la Denominación de Origen Protegida (DOP). El queso curado de oveja Manchego es el queso amparado por una DOP con mayor importancia en España. La designación DOP de queso Manchego garantiza que este queso ha sido elaborado cumpliendo las condiciones que su norma establece. El queso Manchego posee un sabor y aroma característico, donde destaca un gusto residual agradable y peculiar que le confiere la leche de oveja manchega. En este estudio, se emplea el perfil de compuestos volátiles mediante microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPME), acoplada a cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas, el pH, la humedad y espectroscopia de infrarrojo para caracterizar dos grupos de muestras de queso clasificados según si están amparados o no por la DOP. En particular, se estudian cinco quesos con DOP y otros cinco sin DOP. El objetivo es encontrar criterios con los que se puedan establecer diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de muestras. Los resultados muestran que, exceptuando el pH, el resto de métodos empleados poseen al menos un parámetro que diferencie los quesos con DOP, frente a los que no la tienen. Los quesos con DOP presentaban menor contenido en humedad, mayor cantidad de D-limoneno y mayor intensidad en tres bandas del espectro de infrarrojo (1539, 2849 y 2917 cm^{-1}) que los quesos sin DOP. Los resultados sugieren que los quesos con DOP han sufrido en mayor proporción los procesos bioquímicos que se dan durante la maduración del queso frente aquellos sin DOP.

Palabras clave: Queso de oveja, Queso curado, Denominación de Origen, Volátiles, Espectroscopia de infrarrojo.

Characterization of ripened sheep cheese with and without PDO based on volatile compound profile, pH, moisture and ATR-FTIR

Abstract

Food products with differentiated quality, typical from tradition and culture of Spain, are regulated by quality labels, among which the Protected Designation of Origin (PDO) stands out. Manchego ripened sheep cheese is the most important PDO Spanish cheese. The PDO designation of Manchego cheese guarantees that this cheese has been made in compliance with the conditions established by its standard. Manchego cheese has a characteristic flavor and odor, in which highlights a pleasant and distinctive aftertaste that the La Mancha sheep's milk provides it. In the present work, the volatile compound profile studied by headspace solid phase microextraction (HS-SPME), coupled to gas chromatography with mass spectrometry detector (GC-MS), pH, moisture and sample analysis by infrared spectroscopy are used to characterize two groups of cheese simples classified according to whether or not they are covered by the PDO. Specifically, five cheese with PDO and another five without PDO are studied. The aim of the present work is the study of different parameters for the characterization and classification of 2 different ripened sheep cheeses (with and without PDO) based on the use of volatiles compounds, pH, moisture and FTIR. The results showed that, except for pH, the remaining used

methods provide at least one parameter that allows make difference between the studied groups. Compared with cheeses without DOP, samples with PDO have showed a lower moisture content, a higher amount of D-limonene and higher values of the absorption maximum in three bands of the infrared spectrum (1539, 2849 and 2917 cm^{-1}). In this way, results suggest that PDO cheeses have suffered a greater proportion of the biochemical processes occurring along maturation time compared to those without PDO.

Keywords: Sheep cheese, Ripened cheese, Designation of origin, Volatile compounds, Infrared spectroscopy.

Introducción y/o Justificación

El queso es el segundo producto lácteo sólido más importante del mundo (OCDE/FAO, 2020). Se trata de un producto fresco o madurado que se etiqueta según el origen de la leche y de su tiempo de maduración. El mayor porcentaje de quesos, tanto a nivel mundial como nacional, se elabora con leche de vaca, seguido de la de oveja que constituye una cuarta parte del queso producido en España (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021).

Los productos agroalimentarios que presentan características diferenciadas debido al origen de sus materias primas y/o a los procedimientos de elaboración están regulados por las siguientes certificaciones europeas: Denominación de Origen Protegida (DOP), Indicación Geográfica Protegida (IGP) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (ETG). El objetivo común de estas certificaciones es constituir una herramienta legal para proteger tanto al productor como al consumidor (MAPA, 2021).

Con relación a los quesos con calidad diferenciada, destaca el queso de oveja con Denominación de Origen Manchego, que fue el queso con mayor porcentaje de comercialización en el año 2019, correspondiente a más del 50 %, siendo el queso con denominación de origen española con mayor valor económico a nivel global (MAPA, 2019). Se trata de un queso de pasta prensada elaborado con leche de oveja de raza manchega, que le confiere aromas y sabores característicos de quesos curados de oveja (MARM, 2011).

El objetivo de este trabajo es la caracterización de quesos de oveja curados con DOP y la obtención de parámetros discriminantes de quesos curados de oveja con DOP de aquellos que carecen de este certificado. Para ello, se emplean las siguientes técnicas analíticas: el análisis del perfil de compuestos volátiles mediante cromatografía de gases acoplado a masas con microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME-GC-MS), el estudio del pH y contenido en humedad, y el análisis mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier combinada con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Seguido de análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Material y Métodos

Muestras de queso

Las muestras de estudio fueron 30 piezas comerciales de queso curado de leche de oveja iguales o superiores a 1,5 kg. La elección de las piezas de queso compradas se basó en la disponibilidad y en la apariencia del producto. Las muestras se agruparon en dos grupos: 5 tipos de quesos con DOP y 5 tipos de quesos sin DOP. En ese sentido, se eligieron 5 tipos de queso con etiquetado DOP y 5 tipos de queso cuyo aspecto pudiese inducir en el consumidor la creencia de que es un queso manchego certificado. Asimismo, para cada tipo queso, se analizaron 3 lotes diferentes. Todas las piezas de queso se conservaron mediante envasado al vacío y congelación (-18 ºC) hasta el día previo al análisis.

Análisis de los compuestos volátiles por HS-SPME-GC-MS

Para la extracción de los compuestos volátiles, se pesaron los gramos de muestra necesaria, con una precisión de 0,0001 g, en viales de 20 mL, a los cuales se les añadió 2 mL de agua destilada, 5 µL de 2-metil-3-heptanona (patrón interno, 400 ppm) y un agitador magnético de politetrafluoroetileno (PTFE). El vial se cerró con tapón de rosca de aluminio provisto de un septum de PFTE/silicona (Figura 1). Los compuestos volátiles se extrajeron de las muestras mediante la exposición al espacio de cabeza del vial de una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30 µm, Stableflex. Las condiciones de dicho procedimiento se optimizaron mediante un diseño experimental Box-Benhken considerando tres factores independientes: temperatura de extracción (A = 35; 52,5; 70 ºC), tiempo de extracción (B = 15; 37,5; 60 min) y cantidad de muestra (C = 0,5; 1,75; 3 g). La respuesta variable estudiada fue el sumatorio de áreas total de todos los compuestos volátiles extraídos. El diseño realiza un análisis de regresión de los datos experimentales para que se ajusten al modelo matemático descrito por la Ecuación (1):

$$Y=\beta_0+\sum\beta_i X_i+\sum\beta_{ii} X^2_i+\sum\beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Donde Y es la respuesta predicha, X representa las variables del sistema, i y j son las variables del diseño, β_0 es una constante, β_i es el coeficiente lineal, β_{ii} es el coeficiente cuadrático y β_{ij} es el coeficiente de las interacciones entre variables. Se llevaron a cabo un total de 17 experimentos en orden aleatorio sobre muestras de queso curado de oveja con DOP.

La desorción de los compuestos de la fibra en el puerto de inyección del GC-MS se realizó en modo splitless a 205 ºC durante 10 min. El análisis se realizó en un equipo Agilent 7890B/5977B GC/MS con un automuestrador Gerstel MPS, usando una columna capilar de sílice (Agilent 122-1334, 30 m x 250 µm x 1,4 µm) y el siguiente programa de temperaturas: 40 ºC durante 2 min, 5 ºC/min hasta alcanzar los 250 ºC y mantenimiento esa temperatura durante 10 min. Como gas portador se utilizó helio (1 mL/min). Las temperaturas del inyector, el cuadrupolo, la fuente de iones y la de la línea de transferencia fueron 205, 150, 230 y 250 ºC, respectivamente. Los espectros de masas de ionización de electrones se registraron en modo barrido a un nivel de energía de electrones de 70 eV en el rango de 15-350 m/z. La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los datos de los espectros de masas obtenidos con los presentes en la base de datos de NIST (National Institute of Standards and Technology), considerando los compuestos volátiles que tenían un porcentaje de similitud del 90 % o mayor. La determinación semicuantitativa de los compuestos volátiles identificados se evaluó mediante el valor del área relativa (AR) definida como la relación entre el área de los compuestos volátiles de interés y el área del patrón interno. Cada muestra se analizó una vez. Los tres lotes de una misma variedad se consideraron triplicados.

Determinación de pH y humedad

Los procedimientos para la determinación de pH y humedad se realizaron por triplicado los métodos descritos según Siano et al., (2019) utilizando una estufa JP Selecta modelo Conterm y un pH-metro digital modelo basic 20 Crison.

Análisis mediante ATR-FTIR

El análisis de las muestras mediante espectroscopía infrarroja se realizó usando un espectrofotómetro FT-MIR (Jasco FTIR 4700 IRT-5200) con el accesorio ATR. El espectro de infrarrojo se registró en modo absorbancia, entre 500 y 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 escaneos acumulados por muestra. Los análisis se realizaron por triplicado.

Resultados y Discusión

Análisis de los compuestos volátiles por HS-SPME-GC-MS

Del análisis ANOVA del diseño experimental realizado se obtiene que solo la temperatura de extracción (p-valor < 0,05) tuvo influencia estadísticamente significativa en las respuestas estudiadas. Además, este factor presenta un efecto positivo, es decir, a mayor temperatura de extracción, mayor es la respuesta debido a que se volatilizan mayor cantidad de compuestos (Pawliszyn, 2000). El resto de los factores individuales, sus interacciones y sus efectos cuadráticos poseen un p-valor mayor que 0,05; por lo que no tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta estudiada.

Determinación de compuestos volátiles

El análisis de las muestras de queso mediante HS-SPME-GC-MS permitió la identificación de 17 compuestos pertenecientes a diferentes grupos químicos. Cabe destacar que los ácidos (> 90 %) fueron los detectados en mayor cantidad en relación con los diferentes grupos químicos.

Los ácidos contribuyen de manera positiva al típico sabor a queso además de ser precursores de otros compuestos volátiles. Los identificados fueron los ácidos hexanoico, octanoico, nonanoico, decanoico y dodecanoico se forman en el queso por la vía lipídica, es decir, por la hidrólisis de los triglicéridos para formar los ácidos grasos libres (Delgado *et al.*, 2010). La presencia abundante de ácidos grasos de cadena corta, como el ácido hexanoico y el octanoico, aportan sabores picantes característicos de quesos curados. (Urgeghe *et al.*, 2012). Los ésteres identificados son los ésteres etílicos de los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico. En quesos curados, el porcentaje de ésteres es elevado debido a la presencia de etanol y de ácidos grasos libres de cadena corta (McSweeney, 2004). Los ésteres caracterizan el sabor de quesos curados italianos y contribuyen al equilibrio del sabor final del queso porque minimizan el sabor áspero proporcionado por los ácidos grasos (Siano *et al.*, 2019). Las cetonas identificadas (2-heptanona, 2-nonanona y 2-undecanona) pertenecen al subgrupo de metil-cetonas de cadena larga, propios de quesos con largos tiempos de maduración. Las cetonas, en general, aportan olores singulares con notas frutales y florales (Fernández-García, 1996), y presentan umbrales de percepción bajos (Siano *et al.*, 2019). En bibliografía se ha observado que la 2-heptanona y 2-nonanona aportan al aroma notas características del queso azul (Alonso, Fontecha and Juárez, 1999; Siano *et al.*, 2019), que en otro tipo de quesos son considerados como olores indeseables (Wang, Zhang and Li, 2012). El alcohol identificado es el 2-heptanol, procedente probablemente de la reducción de la metil-cetona correspondiente. Los aldehídos, en general, son compuestos transitorios que no se acumulan en quesos por su rápida transformación en los correspondientes alcoholes y ácidos que tiene lugar durante la maduración del queso. El aldehído identificado es el fenilacetaldheído, que junto al 2-heptanol, son compuestos característicos de quesos tipo Grana (Wolf *et al.*, 2010). Las lactonas identificadas en las muestras analizadas son δ-decalactona y γ-undecalactona. En bibliografía se reporta que las diferentes γ- y δ-lactonas tienen notas dulces afrutadas, cremosas y fermentadas (Bovolenta *et al.*, 2014; Siano *et al.*, 2019). Por último, el terpeno identificado en las muestras analizadas es el D-limoneno, que tiene origen en las plantas que forman parte de la alimentación del ganado (Bovolenta *et al.*, 2014; Siano *et al.*, 2019).

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la semicuantificación de todos los compuestos volátiles identificados en las muestras de queso curado de oveja, expresado en términos del área relativa. Cabe destacar el contenido de los ácidos hexanoico, decanoico y octanoico en los dos grupos de muestras de queso analizadas.

Tabla 1. Resultados de compuestos volátiles de las muestras analizadas por grupos de muestras de queso con y sin DOP. Los intervalos de confianza son para la media con 95 %. AR, área relativa: área del compuesto/área del patrón interno.

Nombre	**RT (min)**	**AR con DOP**	**AR sin DOP**
2-heptanona	15,7	3 ± 4	2,2 ± 1,6
2-heptanol	16,1	1,2 ± 1,4	0,10 ± 0,07
Hexanoato de etilo	18,9	1,4 ± 0,5	1,1 ± 0,5
D-limoneno	19,5	1,1 ± 0,7	0,2 ± 0,1
Ácido hexanoico	20,3	130 ± 50	280 ± 180
Fenilacetaldehído	21,8	3 ± 2	1,3 ± 0,5
2-nonanona	22,6	20 ± 30	13 ± 13
Octanoato de etilo	25,2	1,9 ± 0,7	2,3 ± 1,2
Ácido octanoico	26,3	500 ± 300	1000 ± 700
2-undecanona	28,6	10 ± 10	4 ± 5
Ácido nonanoico	28,8	10 ± 5	21 ± 15
Decanoato de etilo	30,8	5 ± 8	9 ± 6
Ácido decanoico	31,6	300 ± 100	1400 ± 1200
δ-decalactona	35,9	4 ± 1	4,4 ± 1,5
Ácido dodecanoico	36,4	21 ± 9	90 ± 80
γ-undecalactona	40,0	6 ± 3	5 ± 2

Respecto al análisis de ANOVA, este indica que, de todos los compuestos volátiles identificados, solamente el contenido en D-limoneno (p-valor < 0,05) presenta diferencias estadísticamente significativas entre los quesos con DOP y sin DOP. El p-valor para cada uno de los compuestos volátiles restantes calculados entre los dos grupos establecidos presenta un valor mayor que 0,05.

Determinación de pH y humedad

Tabla 2. Resultados del análisis de pH y humedad de las muestras de queso con y sin DOP. Diferentes letras en la misma columna significan que existen diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los valores con un 95 % de probabilidad.

-	**pH**	**Humedad (%)**
***Normativa* (MARM, 2011)**	**4,8-5,8**	**Máximo 45 %**
Con DOP	5,45 ± 0,06^{a}	27,8 ± 1,1^{a}
Sin DOP	5,43 ± 0,10^{a}	32 ± 2^{b}
p-valor	0,854	0,005

Los quesos curados de oveja tienen pH ácidos, en parte debido a la proteólisis, el principal proceso bioquímico que tiene lugar durante la maduración del queso. El p-valor > 0,05 que proporciona el análisis de este parámetro mediante ANOVA (Tabla 2) indica que no hay diferencias estadísticamente

significativas con un nivel de confianza del 95 % para el valor de pH entre los grupos estudiados, por lo que el pH no sería un parámetro discriminatorio entre muestras de quesos con DOP y sin DOP.

Respecto al contenido en humedad, el análisis ANOVA de los resultados obtenidos para el parámetro humedad proporciona un p-valor < 0,05 (Tabla 2) que indica que sí hay diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 % en el contenido de humedad entre quesos con DOP y sin DOP. Por tanto, los resultados muestran un mayor porcentaje de humedad en quesos sin DOP, lo que sugiere que este grupo de quesos, que tiene una menor concentración de materia seca que incluye proteínas y grasas mayoritariamente, han podido sufrir en menor proporción los procesos bioquímicos que se dan durante la maduración del queso.

Análisis ATR-FTIR

Mediante el análisis de las bandas de absorción que aparecen en los espectros de ATR-FTIR obtenemos información de las distintas fracciones de nutrientes presentes en las muestras. Las bandas seleccionadas para su análisis se señalan en la Figura 1 y la asignación de éstas a los correspondientes grupos funcionales se muestra en la Tabla 3.

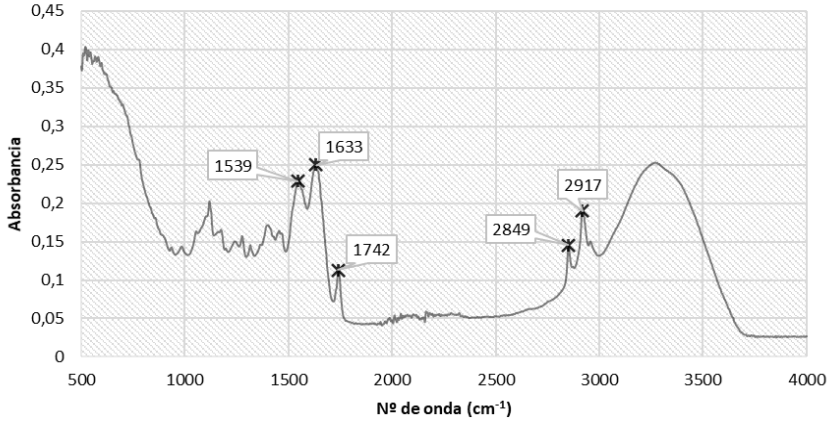


Figura 1. Espectro de absorción ATR de una de las muestras analizadas.

Tabla 3. Asignación de bandas ATR-FTIR.

Intervalo del nº de onda (cm^{-1})	**Grupo funcional**	**Fracción del queso**	**Referencias**
1539-1541	δN–H, νC–N, del enlace peptídico (CO-NH)	Proteica	(Andrade *et al.*, 2018; Ayvaz *et al.*, 2020; De Jesus *et al.*, 2020)
1632-1634	νC=O, νC–N, del enlace peptídico (CO-NH)		
1742-1744	νC=O	Grasa	(Gori *et al.*, 2012; Ayvaz *et al.*, 2020; De Jesus *et al.*, 2020)
2849-2851	νC-H		(Subramanian, Harper and Rodriguez-Saona, 2009; Andrade *et al.*, 2018; De Jesus *et al.*, 2020)
2917-2919	νC-H		

Por lo que respecta al número de onda del máximo de absorción de las bandas seleccionadas (Tabla 4), no existen diferencias estadísticamente significativas (p-valor > 0,05) para ninguna de las bandas analizadas entre quesos con DOP y quesos sin DOP. En general, hay poca información en la bibliografía acerca de las posibles causas de desplazamiento de bandas referido a quesos y se centran más en las diferencias en los valores del máximo de absorción de estas (Andrade *et al.*, 2018; De Jesus *et al.*, 2020).

Tabla 4. Resultados ANOVA del número de onda del máximo de absorción del análisis ATR-FTIR.

Intervalo de nº de onda (cm^{-1})	**Nº onda del máximo de absorción para quesos con DOP (cm^{-1})**	**Nº onda del máximo de absorción para quesos sin DOP (cm^{-1})**	***p*-valor**
1538-1540	1539 ± 2	1541 ± 5	0,638
1632-1634	1633,7 ± 1,3	1634,2 ± 1,9	0,652
1742-1744	1742,48 ± 0,16	1742,5 ± 0,4	0,917
2849-2851	2849,40 ± 0,12	2849,44 ± 0,15	0,638
2917-2919	2917,4 ± 0,3	2917,5 ± 0,4	0,735

Tabla 5. Resultados ANOVA de la intensidad de bandas ATR-FTIR. Diferentes letras en la misma columna significan que existen diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los valores con un 95 % de probabilidad.

Intervalo de nº de onda (cm^{-1})	**Valores de absorbancia en el máximo de absorción para quesos con DOP**	**Valores de absorbancia en el máximo de absorción para quesos sin DOP**	***p*-valor**
1538-1540	0,286 ± 0,010^{a}	0,261 ±0,013^{b}	0,003
1632-1634	0,307 ± 0,001^{a}	0,308 ±0,016^{a}	0,920
1742-1744	0,08 ± 0,03^{a}	0,09 ±0,04^{a}	0,802
2849-2851	0,118 ± 0,005^{a}	0,106 ±0,005^{b}	0,002
2917-2919	0,165 ± 0,006^{a}	0,150 ± 0,006^{b}	0,001

En la Tabla 5 se muestran los resultados relativos a los valores del máximo de absorción de las bandas. El análisis de ANOVA indica que solo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0,05) en los valores del máximo de absorción de las bandas amida II (1539 cm^{-1}) y la correspondiente al enlace C-H (2849 y 2917 cm^{-1}) de la fracción grasa entre los dos grupos de muestras.

Con respecto a la región proteica, la banda amida II (1539 cm^{-1}) es significativamente más intensa en quesos con DOP. En bibliografía se encuentra que el valor del máximo de absorción para la banda amida II (1539 cm^{-1}) aumenta al aumentar la concentración de proteínas con estructuras secundarias (Andrade *et al.*, 2018) además de por la presencia de ciertos aminoácidos como el ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, asparagina, lisina, arginina y tirosina (De Jesus *et al.*, 2020). De este modo, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el valor del máximo de absorción de la banda que aparece a 1633 cm^{-1}, indica que las diferencias significativas encontradas en la intensidad de la banda 1539 cm^{-1} se podrían deber a la presencia de los aminoácidos libres que se mencionan.

Con relación a la fracción grasa del queso, las bandas observadas a 2849 y 2917 cm^{-1} son significativamente más intensas en las muestras de quesos con DOP, insinuando una mayor presencia

de cadenas alifáticas de ácidos grasos en quesos con DOP, es decir, en este tipo de quesos el metabolismo de los ácidos grasos ha ocurrido en menor proporción.

Por tanto, los resultados obtenidos del análisis ATR-FTIR sugieren que las transformaciones bioquímicas producidas en la maduración de quesos con DOP son distintas a las de los quesos sin DOP. Esto puede deberse a diversos factores desde la composición inicial de la leche hasta las etapas finales por las que pasa el queso hasta que llega al establecimiento donde es comprado por el consumidor.

Conclusiones

Para la caracterización de queso curado de oveja, las técnicas analíticas empleadas han resultado ser eficaces. Por un lado, los compuestos volátiles identificados que son responsables del aroma y del sabor del queso, coinciden con aquellos encontrados en bibliografía. Asimismo, la optimización de la metodología de HS-SPME mediante un diseño experimental ha sido satisfactoria para la extracción de dichos compuestos. En cuanto al pH y la humedad, estos parámetros se obtienen mediante procedimientos sencillos que precisan de material común disponible en la mayoría de los laboratorios y permiten comprobar que se cumplen los valores establecidos en las normativas. Con relación a los análisis realizados mediante ATR-FTIR, se ha demostrado que esta técnica proporciona bastante información acerca de las modificaciones en la composición del queso curado de oveja durante su maduración debidas a los diferentes procesos bioquímicos, permitiendo así describir el entramado químico que constituye el queso.

Por otro lado, la autentificación de muestras de queso curado de oveja amparadas por una DOP ha sido posible gracias a la identificación del compuesto volátil D-limoneno, al contenido en humedad y al valor del máximo de absorción de las bandas que aparecen a 1539, 2849 y 2917 cm^{-1}. Estos 5 parámetros se proponen como indicadores capaces de establecer diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de quesos con DOP de las que no tienen DOP. No obstante, se deben considerar las limitaciones del presente estudio, pues se desconocen todas las variables implicadas en la fabricación de los quesos y que, podrían influir en los parámetros estudiados. A pesar de la variabilidad de estos factores, las diferencias estadísticamente significativas encontradas en los 5 parámetros mencionados indican la posibilidad de la implementación de su determinación en la industria quesera como controles de calidad del queso curado de oveja, pues los procedimientos experimentales empleados son rápidos y sencillos de realizar, además de ser susceptibles de automatización. De este modo, los productores de queso curado de oveja con DOP verían sus productos respaldados y protegidos por estos controles y, en ese sentido, los consumidores valorarían más positivamente este tipo de productos dada la credibilidad que estos controles le podrían conferir.

Bibliografía

Alonso, L., Fontecha, J. and Juárez, M., 1999. Development of a headspace gas chromatographic-mass spectrometric method for determining methyl-ketones and secondary alcohols in blue cheese. J. Chromatographic Sci., 37, 108–112. https://doi.org/10.1093/chromsci/37.4.108.

Andrade, J. et al., 2018. Long-term ripening evaluation of ewes' cheeses by fourier-transformed infrared spectroscopy under real industrial conditions. J. Spectroscopy. Hindawi, 1381864. https://doi.org/10.1155/2018/1381864.

Ayvaz, H. et al., 2020. Near- and mid-infrared determination of some quality parameters of cheese manufactured from the mixture of different milk species, J. Food Scie. Technol. http://doi.org/10.1007/s13197-020-04861-0.

Bovolenta, S. et al., 2014. Volatile compounds and sensory properties of montasio cheese made from the milk of simmental cows grazing on alpine pastures. J. of Dairy Science, 97, 7373–7385. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8396.

Delgado, F. J. et al., 2010. Characterisation by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. Food Chemistry, 118, 182–189. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.081.

Fernández-García, E., 1996. Use of headspace sampling in the quantitative analysis of artisanal spanish cheese aroma. J. Agricultural and Food Chemistry, 44, 1833–1839. https://doi.org/10.1021/jf950601n.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021. FAOSTAT. httpwww.fao.orgfaostaten#dataQP (accessed 14 May 2021).

Gori, A. et al., 2012. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. International Dairy J. 23, 115–120. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.005.

De Jesus, J. C. et al., 2020. Quick identification of the time of maturation of artisanal minas cheese by FTIR-ATR spectroscopy and multivariate techniques. J. the Brazilian Chemical Society, 31, 2000–2011. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200100.

MAPA, 2019. Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (E.T.G.) de Productos Agroalimentarios. Madrid. http://publicacionesoficiales.boe.es/. (accessed: 10 may 2021).

MAPA, 2021. Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/dop-igp/ (accessed: 10 may 2021).

MARM, 2011. Resolución de 27 de enero de 2011, de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la modificación de la Denominación de Origen Protegida «Queso Manchego». Boletín Oficial del Estado, 18141–18149.

McSweeney, P. L. H., 2004. Biochemistry of cheese ripening. International J. Dairy Technology, 57, 127–144. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.

OCDE/FAO, 2020. OCDE−FAO Perspectivas Agrícolas 2020−2029. https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/ocde-fao-perspectivas-agricolas-2020-2029_a0848ac0-es. (accessed: 10 may 2021).

Pawliszyn, J., 2000. Theory of Solid-Phase Microextraction. J. Chromatographic Sci., 38, 270-278. https://doi.org/10.1093/chromsci/38.7.270

Siano, F. et al, 2019. Chemical-nutritional composition, microbiological analysis and volatile compound content of fossa cheese ripened in different pits. Italian J. Food Science, 31, 669–684.0 https://doi.org/10.14674/IJFS-1470.

Subramanian, A., Harper, W. J. and Rodriguez-Saona, L. E., 2009. Rapid prediction of composition and flavor quality of cheddar cheese using ATR-FTIR spectroscopy. J. Food Sci., 74, 292–297. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01111.x.

Urgeghe, P. P. et al., 2012. SPME/GC-MS Characterization of the Volatile Fraction of an Italian PDO Sheep Cheese to Prevalent Lypolitic Ripening: the Case of Fiore Sardo. Food Anal. Methods, 5, 723–730. https://doi.org/10.1007/s12161-011-9302-5.

Wang, W., Zhang, L. and Li, Y., 2012. Production of volatile compounds in reconstituted milk reduced-fat cheese and the physicochemical properties as affected by exopolysaccharide-producing strain. Molecules, 17, 14393–14408. https://doi.org/10.3390/molecules171214393.

Wolf, I. V. et al., 2010. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. Food Research International, 43, 1204–1211. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.018.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Reducción parcial de sal y grasa en salchichas tipo Frankfurt con adición de harina de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*

M.I. Cerón-Guevara [1], E. Rangel-Vargas [1], J.M. Lorenzo [2], R. Bermúdez [2], M. Pateiro [2], J.A. Rodríguez [1], I. Sánchez-Ortega [1], E.M. Santos [1]

[1] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Química, Crta. Pachuca-Tulancingo KM 4.5 s/n, Col. Carboneras, Mineral de la Reforma, HID 42184, México; ce130148@uaeh.edu.mx
[2] Centro Tecnológico de la Carne, Rúa Galicia No.4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrao das Viñas, 32900 Ourense, España; jmlorenzo@ceteca.net

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la sustitución parcial del 30 y 50 % de la grasa de cerdo y del 50 % de la sal mediante la adición de harina comestible de hongos comestibles (2.5 y 5.0 %) de *Agaricus bisporus* (Ab) y *Pleurotus ostreatus* (Po) evaluando las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de salchichas Frankfurt durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración. La adición de harinas aumentó el contenido de humedad y el de fibra dietética en las muestras enriquecidas con las harinas de hongos, mientras que el perfil de aminoácidos se mantuvo. La oxidación lipídica mostró valores aceptables, sin embargo, aunque no se observó un efecto antioxidante por la presencia de las harinas de hongo. Durante el almacenamiento en refrigeración se observó la presencia de bacterias formadoras de esporas. El color y la textura fueron afectados por la adición de las harinas de hongos, obteniendo muestras más oscuras por la adición de Ab, mientras que la adición de harina Po resultó en salchichas más blandas y menos cohesivas. Las puntuaciones sensoriales de los parámetros de color, sabor y aroma fueron menores en las muestras con harinas de hongos en comparación con el control, no obstante, se consideraron en el nivel aceptable confirmando que la inclusión de 2.5 y 5.0 % de las harinas Ab y Po en salchichas Frankfurt reducidas en grasa y sal resulta en una estrategia factible y de gran interés para mejorar el perfil nutricional de estos productos.

Palabras clave: harina de hongos comestibles, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, productos cárnicos saludables

Reduction of salt and fat frankfurter sausages by addition of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* flour

Abstract

The objective of this study was to evaluate the partial replacement of 30 and 50 % of pork backfat and 50 % of salt by adding edible mushroom flour (2.5 and 5.0 %) from *Agaricus bisporus* (Ab) and *Pleurotus ostreatus* (Po) on physicochemical, microbiological and sensory properties of frankfurters sausages during cold storage. The addition of flours increased the moisture, and the dietary fiber contents in frankfurters, keeping the amino acid profile. Lipid oxidation remained under acceptable values despite not antioxidant effect was observed by mushrooms flours. Only spore-forming bacteria were found during cold storage. Color and texture were modified by addition of mushroom, being the Ab samples darker, while Po flour addition resulted in softer and less cohesive sausages. Although lower color, flavor, and taste scores were given to the mushroom samples than the control, they ranked in the acceptable level confirming that the inclusion of 2.5 and 5.0 % of Ab and Po flours in fat- and salt-reduced frankfurter sausages resulted a feasible strategy to enhance the nutritional profile these products.

Keywords: edible mushroom flour, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, healthier meat products

Introducción

La carne y productos cárnicos son una fuente nutricional importante en la dieta humana, sin embargo, debido a su alto contenido de grasa y sal, así como su consumo habitual se encuentran relacionados con el padecimiento de diferentes enfermedades como diabetes, problemas cardiovasculares y diabetes. Actualmente, una de las tendencias para mejorar la calidad nutricional de los productos cárnicos es la reducción de grasa y sal, así como la adición de fibra, por medio de la incorporación de fuentes vegetales (Pintado et al., 2016). En este contexto los hongos *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* son una fuente de nutrientes esenciales, con alto contenido en proteína (16.47-36.96 %), bajo contenido de grasa y alto contenido de fibra (24.4-46.62 %) (Fernandes et al., 2015; Ramos et al., 2019), además imparten sabor umami lo que podría contribuir en la reducción de sal en formulaciones cárnicas.

Material y Métodos

Se adquirieron lotes de 4 kg de hongos comestibles Ab y Po en el mercado local de Mineral de la Reforma (Hidalgo, México). Los parámetros de elección fueron el color claro, daño visual, madurez y tamaño. Estuvieron sujetos a sanitización con agua potable, se eliminó el exceso de agua y cortaron en tiras de 5 mm de grosor. Las muestras de Ab se escaldaron en solución de ácido acético (2.0 %) a 80 °C durante 10 min, posteriormente se aplicó un choque térmico a 4 °C, para evitar reacciones enzimáticas. Después se sometieron a proceso de secado en horno de recirculación de aire (CE5F, Shel Lab, Cornelius, OR, USA) a 60 ± 3 °C durante 18 h, pasando a molienda por un molino ciclónico UDY (UDY Corp., Fort Collins, CO, USA) y tamizadas a través de malla de 0.5 mm. Las harinas obtenidas se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas herméticas de polietileno bajo oscuridad hasta su uso.

Los lotes de salchichas se elaboraron en el Centro Tecnológico de la Carne (Ourense, España). Se diseñaron cinco formulaciones para reducir el contenido de grasa (30 % y 50 %) así como sal, fosfatos y caseinato (50 %) mediante la adición de harinas de hongos comestibles Ab y Po (2.5 % y 5.0 %, respectivamente), en comparación con el control elaborado con 25 % de grasa y 1.5 % de sal, 2.0 % de caseinato de sodio y 0.5 % de fosfatos. MF-Ab y MF-Po fueron los códigos para identificar a las muestras de salchicha con 30 % reducidas en grasa (mitad de grasa) y 50 % en reducción de sal-fosfatos-caseinato, y con adición de 2.5 % de las harinas de Ab y Po, respectivamente. LF-Ab y LF-Po fueron los códigos utilizados para la identificación de las muestras de salchicha con reducción de grasa del 50 % (bajo contenido de grasa) y reducción al 50 % de sal-fosfatos-caseinato, con adición de 5.0 % de harina de Ab y Po, respectivamente. Se asignó con el código MF-AbPo para identificar las muestras con reducción de grasa al 30 % y 50 % de reducción de sal-fosfatos-caseinato, con adición de 5.0 % de la mezcla de las harinas Ab y Po (2.5 % de cada harina).

Antes del proceso de elaboración, se añadió a la carne cloruro de sodio y ascorbato de sodio con un periodo de reposo de 2 h. La carne y grasa se procesaron, utilizando placas de 8 mm y 6 mm respectivamente en una picadora de carne con refrigeración (La Minerva, Bologna, Italy). A la carne se le añadió previamente el almidón de papa y 50 % de caseinato de sodio total (disuelto en agua). Después, se agregaron el resto de los ingredientes con la grasa y se mezclaron hasta homogenizar en un cúter con enfriamiento (TALSA K30 0542, EU). La masa de carne obtenida se embutió en tripas de colágeno de 25 mm con un equipo automático (SIA, Junior, Barcelona, España) formando salchichas de 10 cm de largo. Las salchichas crudas se cocinaron en un baño de agua a temperatura controlada (Marmite Mera 120*70, Talsa, Talsabell S.A., Valencia, España) a 90 °C durante 20 min. Después las salchichas cocidas se enfriaron en un baño de hielo. Se envasaron al vacío cuatro salchichas (V900, Sociedad Mercantil Tecsaclor, S.L., España) en cada bolsa de polietileno se pasteurizaron a 90 °C durante 30 min y se almacenaron a 2 °C hasta su análisis de laboratorio durante el periodo de almacenamiento de 90 días. Se tomaron cuatro paquetes de salchichas de cada lote a los 0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento. Todos los análisis se realizaron por triplicado para cada formulación. La composición química y perfil de aminoácidos se evaluaron sólo el día 0. Después de tomar las

muestras para el análisis microbiológico, las salchichas se oxigenaron durante 30 min a temperatura ambiente durante el resto del análisis.

Para el análisis de composición química, humedad, cenizas y las proteínas se cuantificaron según las normas recomendadas por la Organización Internacional de Normalización (ISO) 1442:1997 (ISO, 1997), 936:1998 (ISO, 1998) y 937:1978 (ISO,1978), respectivamente. La grasa total fue extraída por Ankom XT10 (Ankom Technology Corp., Macedon, NY, EE. UU.), bajo el procedimiento Oficial Am 5-04 (A.O.C.S., 2005). El contenido de proteínas fue estimado por el método Kjeldahl (N × 6.25) por un digestor (Gerhardt Kjeldatherm KB, Bonn, Alemania). El contenido de fibra dietética (total (TDF), insoluble (IDF) y la fibra soluble (FDS) se determinaron con el kit de ensayo de fibra dietética TDF-100A (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.) según los procedimientos de AOAC (AOAC, 1996). El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia. El contenido de Na se determinó a partir de las cenizas de 5 g en alícuotas de cada muestra disuelta en 10 mL de 1M HNO_3, y analizado por espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP) (Thermo-Fisher, Cambridge, Reino Unido) de acuerdo con la metodología descrita por Lorenzo et al. (2015). Las soluciones estándar (50, 100, 150, 200 mg/L) se prepararon a partir de una solución en estándar de Na (1000 mg/L; SCP-SCIENCE, Courtaboeuf, Francia) en 4.0 % HNO_3 (v/v). Los resultados se expresaron como mg/100 de salchicha.

Para la identificación y cuantificación de aminoácidos se consideró la metodología de Marti-Quijal et al. (2019) por derivatización de aminoácidos con carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (kit de reactivos Waters AccQ-Fluor) y análisis de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) (módulo de separaciones Waters 2695 + detector de fluorescencia múltiple Waters 2475 + Waters-Tag de columna de análisis de aminoácidos). El software avanzado Empower 2TM (Waters) se utilizó para controlar el funcionamiento del sistema y la gestión de resultados. Los aminoácidos se identificaron por tiempos de retención y se cuantificaron mediante una técnica estándar externa utilizando un estándar de aminoácidos (Amino Acid Standard H, Thermo, Rockford, USA).

Para evaluar la estabilidad lipídica, se llevó a cabo el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) de acuerdo con la metodología de Vyncke (1975) descrita por Cerón-Guevara et al. (2020), la absorbancia se midió a 532 nm. Se utilizó una curva estándar de malondialdehído (MDA) con fines de cuantificación, y los resultados se expresaron en miligramos de MDA por kilogramo de muestra.

Los recuentos totales viables (TVC) y las bacterias ácido lácticas (BAL) se determinaron utilizando el sistema TEMPO (TEMPO Filler, TEMPO Reader, BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia), basándose en el método numérico más probable, después de la incubación a 30 °C para 24 y 48 h, respectivamente (límite de detección de 0.3 UFC/g de muestra). El recuento de *Pseudomonas* spp. se realizó con agar base Pseudomonas con suplemento selectivo para este grupo (Oxoid) después de la incubación a 25 °C durante 48 h. Las bacterias aeróbicas psicrótrofas se enumeraron con recuento en placas agar (PCA; Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Reino Unido) después de la incubación a 7 °C durante 10 días.

Los parámetros CIELAB (L*: luminosidad; a* rojo y b*: amarillo) se midieron en cortes de 2 cm de grosor utilizando un colorímetro portátil (Konica Minolta CM-600d, Osaka, Japón) bajo iluminación D65 y observador de 0° con una apertura de 8 mm.

Se utilizó un analizador de textura (TA-XT.plus, Stable Micro Systems, Vienna Court, UK) equipado con el software Exponent 32 Texture (versión 1.0.0.68) para la evaluación del perfil de textura (TPA). Las muestras de salchicha se cortaron en trozos de 2.5 cm de altura × 2 cm de diámetro. Se midieron los parámetros de dureza (N), elasticidad (mm), masticabilidad (N/mm), gomosidad (N) y cohesividad (mm/mm) (Bourne,1966). Los parámetros de textura se midieron comprimiendo al 50 % con la prueba de doble ciclo de compresión utilizando una sonda de cilindro de aluminio p/5 (diámetro de 5 mm, Aname) equipada con una celda de 50 kg a una velocidad de 20 mm/s y para una distancia de 30 mm e instalada, Stable Micro Systems, Vienna Court, UK). Se midieron tres cortes de cada muestra.

La evaluación sensorial de las salchichas Frankfurt se realizó con la participación de veinte panelistas capacitados y seleccionados entre los miembros del Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, siendo los participantes capacitados de acuerdo con la normativa ISO (ISO:2012) con los atributos y la escala para evaluar el color decoloración superficial y olor de las muestras crudas almacenadas por 0, 30, 60 y 90 días, utilizando una hedónica de 5 puntos, considerando desde 1= "excelente" a 5= "no aceptable" (Cerón-Guevara et al., 2020). Asimismo, se evaluó el olor y sabor de las rebanadas de 1cm de grosor cocidas a 180 °C hasta alcanzar una temperatura interna de 72 °C, en el día 0. Se utilizó pan sin sal y agua para limpiar el paladar entre cada muestra.

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.03 (StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, EE. UU.). Se utilizó la prueba de Tukey para comparar los valores medios a un nivel de significancia de $p<0.05$.

Resultados y Discusión

Los resultados de la composición química se muestran en la Tabla 1. La adición de las harinas de hongo resultó en un aumento de humedad significativo (P<0.05) (64.34-66.48 %) en comparación con el control (61.05 ± 0.17 %). La mayor concentración de harina resultó en los valores de humedad más altos en LF-Ab y LF-Po. Estos incrementos de humedad se podrían atribuir a la mayor cantidad de agua agregada para compensar la reducción de grasa en la formulación y la presencia de harinas de hongos, que es alta en fibra dietética. Los contenidos de fibra dietética total de las harinas de Ab y Po fueron 22.82 ± 0.42 % y 43.58 ± 1.33 % en peso seco, respectivamente. Varios estudios han señalado que la capacidad porosa e hidrófila de la fibra dietética contribuye a que las propiedades de retención de agua aumenten la humedad (Elleuch et al., 2011; Figuerola et al., 2005).

Tabla 1. Composición química (%) y contenido de sodio (mg/100 g) de salchicha Frankfurt elaborada con harinas de hongos comestibles (Agaricus bisporus y Pleurotus ostreatus).

	Control	MF-Ab	MF-Po	LF-Ab	LF-Po	MF-PoAb
Humedad	61.05±0.17^{a}	64.34±0.13^{b}	65.91±0.21^{d}	66.34±0.50^{de}	66.48±0.30^{e}	65.37±0.55^{c}
Grasa	19.16±0.42^{f}	16.28±0.33^{e}	15.18±0.29^{d}	12.99±0.30^{b}	11.79±0.06^{a}	14.04±0.47^{c}
Proteína	14.39±0.14^{b}	14.70±0.27^{b}	13.62±0.22^{a}	15.41±0.54^{c}	14.59±0.33^{b}	14.29±0.24^{b}
Cenizas	2.08±0.05^{d}	1.30±0.04^{a}	1.36±0.06^{ab}	1.36±0.08^{ab}	1.81±0.03^{c}	1.41±0.05^{b}
Carbohidratos	3.32±0.25^{a}	3.37±0.39^{a}	3.93±0.31^{b}	3.90±0.19^{b}	5.33±0.04^{d}	4.88±0.21^{c}
Fibra dietética	0.05±0.09^{a}	0.57±0.06^{b}	1.09±0.11^{c}	1.14±0.09^{c}	2.18±0.25^{e}	1.58±0.17^{d}
Na (mg/100g)	686.30±37.10^{c}	338.69±40.53^{a}	336.46±17.97^{a}	345.22±30.47^{a}	405.19±12.53^{b}	347.48±4.07^{a}

Resultados se expresan como valor de la media ± desviación estándar. $^{a–e}$: Diferentes letras en cada lote indican diferencia significativa $p < 0.05$).

Los lotes formulados con menor contenido de grasa y sal dieron como resultados concentraciones significativamente menores ($p<0.05$), lo que era de esperarse debido a la modificación en las formulaciones. El mismo comportamiento se observó en el contenido de cenizas, el cual se relaciona con la reducción de sodio en las formulaciones (Cerón-Guevara et al., 2020). La reducción de grasa en las emulsiones cárnicas puede provocar cambios en los parámetros de estabilidad de la emulsión, como pérdida de grasa y agua durante la cocción. Por tanto, la industria cárnica ha adoptado nuevas tendencias para mejorar la textura y la capacidad de retención de agua, sustituyendo la grasa animal al incluir el uso de ingredientes no cárnicos, considerando la capacidad de la fibra para retener grasa y agua (Álvarez et al., 2012). Cuando se analizó el contenido de proteína de las salchichas, sólo las muestras con 5.0 % de harina de Ab presentaron un contenido de proteína significativamente mayor ($p<0.05$) de acuerdo con lo reportado por Reis et al. (2012) y Cheung (2013). Cuando el contenido de proteína se reporta en peso seco (PS) todas las formulaciones de hongos presentaron contenidos significativamente más altos (más del 40 % PS) que 36.94 de las muestras control, siendo LF-Ab y LF-Po las muestras con los valores más altos 45.77 ± 1.07 g/100g y 43.52 ± 0.62 g/100g en PS, respectivamente. Los lotes con adición de harina Ab y Po mostraron mayor contenido de fibra en un rango de 0.57 y 2.18 g/100g de salchicha en comparación con el control (0.05 ± 0.09 g/100 g de salchicha). LF-Po presentó mayor contenido de fibra dietética con 6.51 ± 2.79 g/100 g de salchicha

(PS), ya que la harina de Po presentó mayor contenido de fibra. De igual manera las muestras MF-AbPo mostraron un contenido interesante de fibra 1.58 ± 0.17 g/100g de salchicha, siendo una alternativa prometedora para un embutido más saludable, manteniendo el contenido de proteína con la mitad de caseinato de sodio añadido. Algunos trabajos han incluido diferentes fuentes de vegetales, legumbres para aumentar el contenido de fibra en estos productos (Henning et al., 2016; Pintado et al., 2016).

Al analizar el perfil de aminoácidos de los diferentes tratamientos de salchicha (Tabla 2) no se observaron cambios significativos (P>0.05). Algunos estudios se han centrado en la adición de fuentes proteicas no cárnicas como legumbres o incluso algas con la finalidad de mejorar el perfil proteico en los productos cárnicos (Cofrades et al., 2017; Marti-Quijal et al., 2019). En este caso la adición de las harinas de hongos comestibles no modificó el perfil de aminoácidos, manteniendo la proporción entre aminoácidos esenciales y no esenciales en 0.93-0.94. Los aminoácidos que predominaron en las formulaciones fueron ácido glutámico (entre 2.58-2.84 g/100g), ácido aspártico (1.44-1.66 g/100g), lisina (1.38-1.54 g/100g) y leucina (1.31-1.43 g/100g). Estos aminoácidos en conjunto con alanina y arginina también son los más importantes en los hongos comestibles (Deepalakshmi et al., 2014), siendo el ácido glutámico y aspártico los que tienen mayor relación con el sabor umami (Bach et al., 2017). Es este estudio el 50 % de caseinato fue sustituido por la harina de hongos Ab y Po en las formulaciones, pero no mostraron diferencias significativas (P>0.05) en los perfiles de aminoácidos, de tal manera que se podría sugerir que las harinas de hongos podrían reemplazar parcialmente el contenido de carne para o ser considerados como sustitutos de carne.

Tabla 2. Perfil de aminoácidos (g/100 g muestra) de proteína de Frankfurt con adición de harinas de hongos comestibles.

Aminoácido	Control	MF-Ab	MF-Po	LF-Ab	LF-Po	MF-PoAb
OH-Prolina	0.21±0.01	0.18±0.01	0.15±0.01	0.18±0.01	0.18±0.06	0.19±0.02
Ácido aspártico	1.44±0.20	1.52±0.03	1.49±0.01	1.66±0.20	1.44±0.29	1.62±0.19
Serina	0.65±0.07	0.64±0.03	0.64±0.01	0.72±0.06	0.65±0.11	0.73±0.03
Ácido glutámico	2.67±0.37	2.65±0.01	2.59±0.01	2.81±0.29	2.58±0.55	2.84±0.26
Glicina	0.95±0.06	0.85±0.01	0.92±0.01	0.95±0.05	1.00±0.21	1.01±0.01
Alanina	0.88±0.10	0.88±0.01	0.91±0.03	0.93±0.10	0.90±0.23	0.95±0.08
Cisteína	0.10±0.01	0.09±0.01	0.09±0.02	0.11±0.01	0.11±0.02	0.12±0.01
*Valina	0.91±0.14	0.89±0.04	0.90±0.06	0.96±0.12	0.92±0.24	0.98±0.04
Metionina	0.40±0.05	0.40±0.01	0.38±0.01	0.41±0.10	0.42±0.09	0.48±0.06
*Isoleucina	0.81±0.15	0.80±0.05	0.79±0.04	0.85±0.12	0.79±0.19	0.87±0.04
*Leucina	1.35±0.24	1.33±0.09	1.31±0.08	1.41±0.19	1.31±0.32	1.43±0.06
Tirosina	0.40±0.05	0.40±0.02	0.38±0.04	0.46±0.04	0.42±0.07	0.44±0.03
*Fenilalanina	0.69±0.10	0.67±0.06	0.67±0.04	0.73±0.08	0.69±0.13	0.73±0.01
*Histidina	0.54±0.03	0.51±0.01	0.52±0.01	0.57±0.06	0.56±0.11	0.58±0.01
*Lisina	1.45±0.20	1.50±0.04	1.46±0.01	1.54±0.12	1.38±0.28	1.53±0.22
*Arginina	0.93±0.09	0.92±0.03	0.90±0.01	0.97±0.05	0.90±0.14	0.97±0.12
Prolina	1.05±0.17	0.97±0.04	0.96±0.07	1.02±0.13	0.94±0.34	1.05±0.02
Taurina	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
*Treonina	0.73±0.08	0.73±0.03	0.71±0.02	0.78±0.04	0.72±0.12	0.80±0.07
Total	16.16±2.09	15.94±0.39	15.79±0.29	17.07±1.77	15.93±3.51	17.35±1.06
Esencial (E)	7.81±1.09	7.74±0.27	7.64±0.20	8.22±0.88	7.70±1.63	8.38±0.51
No-esencial (Ne)	8.35±1.00	8.19±0.12	8.14±0.09	8.85±0.89	8.23±1.88	8.97±0.55
E/Ne	0.93±0.02[a]	0.94±0.02[a]	0.94±0.01[a]	0.93±0.01[a]	0.94±0.02[a]	0.93±0.01[a]

Ab: *Agaricus bisporus*; Po: *Pleurotus ostreatus; * aminoácido esencial.* [a] Diferentes letras en cada lote indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

La estabilidad lipídica se evaluó durante el tiempo de almacenamiento durante los días 0, 30, 60 y 90 (Figura 1), los valores de TBARs se vieron afectados significativamente ($p<0.05$) por la concentración de las harinas de hongos comestibles añadidas durante el tiempo de almacenamiento. Inicialmente, los valores de TBARs en las muestras con adición de las harinas de hongos y menor contenido de grasa fueron significativamente mayores ($p<0.05$) con un rango entre 0.34-0.72 mg MDA/Kg que los valores registrados en las muestras control con 0.12 mg MDA/Kg. Este comportamiento se mantuvo durante el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos con harinas de Ab y Po presentaron valores de TBARs por debajo del límite aceptable (<1.0 mg MDA/kg) (Choi et al.,

2010). Se ha descrito que los hongos poseen propiedades antioxidantes, debido a la presencia de compuestos fenólicos, las cuales dependen de la especie de hongo, condiciones de cultivo, recolección y procesamiento (González-Palma et al., 2016). Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que el no hubo un efecto antioxidante por la adición de las harinas de hongos comestibles, en el caso de LF-Ab y LF-Po con mayor concentración de harinas reducción al 50 % de grasa, presentó valores mayores de TBARs, cuando debió esperarse una reducción de este parámetro. Por tanto, se relaciona este efecto en las muestras con adición de las harinas de hongo a las condiciones de secado aplicadas durante la obtención de las harinas, que pudieron promover reacciones de pardeamiento y productos de degradación de proteínas, favoreciendo la formación de complejos reactivos al ácido tiobarbitúrico, afectando los valores de TBARs, tal como lo ha reportado Papastegriadis et al. (2012). En el caso de los valores más altos de TBARs de las muestras con harina Ab, específicamente en el día 60 en comparación con las muestras con harina de Po, se podrían atribuir a más productos de reacción de pardeamiento presentes en las muestras de Ab que reaccionaron con el ácido tiobarbitúrico ya que la harina presenta un color más oscuro.

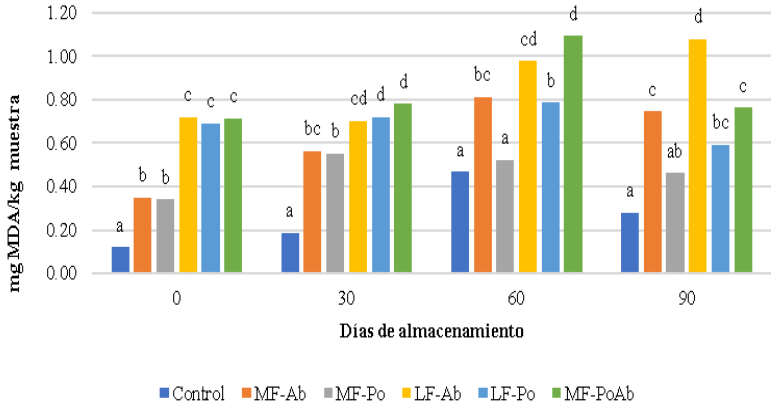


Figura 1. Resultados de TBARs (mg MDA/Kg) en salchichas con adición de harina de Ab y Po. a–d: Diferentes letras en cada lote indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

Microbiológicamente, el proceso de cocción y pasteurización posterior al envasado eliminaron los microorganismos, por lo que las bacterias acido lácticas, pseudomonas y las bacterias psicotrofas permanecieron por debajo de los límites de detección. Sin embargo, se registraron recuentos entre 4.52 ± 0.14 - 6.12 ± 0.08 UFC/g para totales viables para las muestras de salchicha con la adición de las harinas de hongos mucho más altos que los reportados por las muestras control 1.68 ± 0.08 UFC/g, permaneciendo estables durante el almacenamiento en refrigeración. Estos valores altos de microorganismos se pueden atribuir a las bacterias formadoras de esporas presentes de forma natural en los productos agroalimentarios en contacto con el suelo, como verduras y hongos comestibles, que sobrevivieron al tratamiento térmico. Sin embargo, en todos los tratamientos los recuentos altos no se consideran un riesgo mientras se mantengan las temperaturas de refrigeración.

La adición de harina de hongos redujo significativamente ($p<0.05$) la luminosidad debido a la reducción de grasa, aunque la harina de Po disminuyó el parámetro L* en menor medida (LF-Po 60.63 ± 0.35– MF-Po 63.90 ± 0.48) en comparación con la harina Ab (LF-Ab 57.57 ± 4.31 – MF-Ab 58.57 ± 0.64). El parámetro b* en las muestras con adición de las harinas de hongo incrementó, especialmente en los tratamientos con la harina de Po. Las muestras de Ab mostraron valores de a* significativamente más bajos ($p<0.05$) en comparación con las muestras control, mientras que la incorporación de la harina de Po aumentó significativamente ($p<0.05$) este parámetro. Por tanto, se observó que la harina de Ab contribuyó a reducir significativamente ($p<0.05$) los valores de L* y a* en comparación con el control aportando un color más oscuro a las salchichas como se puede observar en la Figura 2. El cambio de color en los productos cárnicos reformulados dependerá no sólo de la fuente del ingrediente, sino también de la concentración agregada (Henning et al., 2016). Demostrando que

los pigmentos naturales suelen presentar menor estabilidad de color (Mercadante et al., 2010), las salchichas con harinas de hongos se mantuvieron estables, aunque se observó un ligero aumento en el parámetro de luminosidad, probablemente debido a la oxidación de la grasa. Finalmente, la presencia de harinas de hongos no se evaluó negativamente en el análisis sensorial.

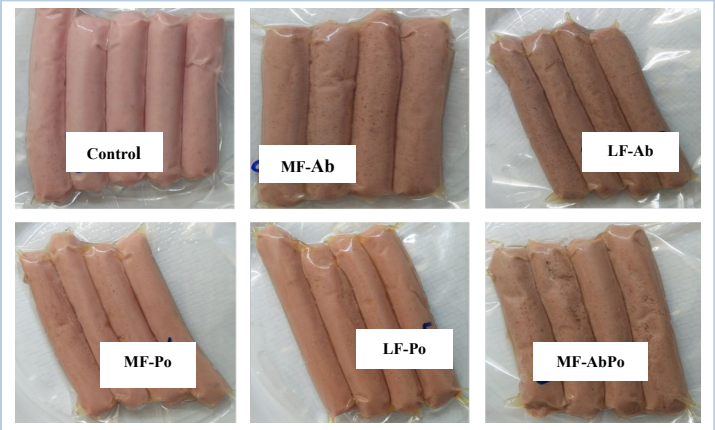


Figura 2. Apariencia visual de Frankfurt con diferentes formulaciones.

La adición de 2.5 % y 5.0 % de harina de hongos comestibles también afectó significativamente (p<0.05) los parámetros de textura evaluados en los tratamientos de salchicha con disminución parcial de grasa (30 % y 50 %) y sal (Figura 3). Todas las muestras adicionadas con las harinas de hongo mostraron valores significativamente (p<0.05) más bajos de dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad en comparación con el control después de su elaboración. Los tratamientos con harina de Po (2.5 y 5.0 %; MF-Po y LF-Po), incluso en combinación con la harina de Ab (MF-AbPo) registraron valores más bajos en los parámetros de textura, resultando en salchichas más suaves. En las emulsiones la grasa se dispersa en pequeñas gotas en una fase continua formada por agua, proteínas y aditivos. Cuando se reduce el contenido de grasa, la emulsión puede perder estabilidad y afectar la textura. En general, cuando la reducción de grasa se compensa con el aumento de proteínas, la textura tiende a ser más dura. En cambio, cuando el contenido de grasa se reduce aumentando la proporción de agua, manteniendo la cantidad de proteína, la estructura de los sistemas bajos en grasa se vuelve más suave (Salcedo-Sandoval et al., 2013). En este caso, la sustitución de grasa por la adición de las harinas de hongo condujo a un mayor contenido de agua en las formulaciones, el contenido de proteína y fibra en las harinas podrían favorecer la unión de agua, reduciendo la dureza y el resto de los parámetros de textura dependiendo de la concentración de harina integrada. En este caso la adición de la harina de Ab ayudó a estabilizar la emulsión, incluso si se reduce en la formulación otra fuente de proteína, como el caso del caseinato de sodio. En general, los parámetros de textura también se vieron afectados (p<0.05) por el almacenamiento en refrigeración aumentando todos los parámetros, pero especialmente la dureza en las muestras control en comparación con las salchichas tratadas con harinas de hongos comestibles. Se ha reportado un aumento de la dureza durante el almacenamiento en las salchichas como consecuencia del aumento de la pérdida de agua (Salcedo-Sandoval et al., 2013).

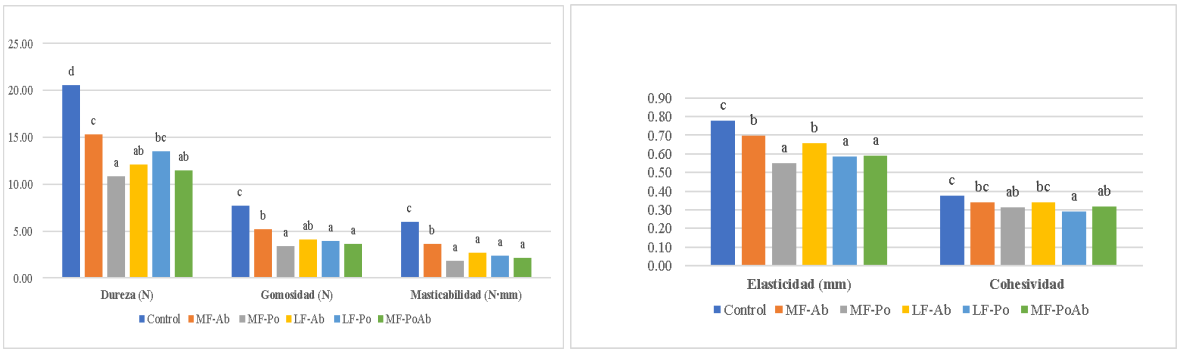


Figura 3. Parámetros de textura en salchicha Frankfurt con harina de hongos comestibles. a–d: Diferentes letras en cada lote indica diferencia significativa (p<0.05).

Respecto a los atributos sensoriales en las muestras de salchicha antes de cocción (color, decoloración superficial) no se detectaron diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos con puntuaciones para color entre bueno y aceptable (2.17-2.83) y para decoloración superficial no se observaron (Figura 4). La evaluación del olor indicó que las muestras con Ab (MF-Ab, LF-Ab, MF-PoAb) y LF-Po presentaron un olor más intenso, con puntuaciones por encima del nivel aceptable, mientras que MF-Po no fue significativamente (P>0.05) diferente con el control. Cuando las muestras se cocinaron, la reducción de grasa y sal, por la adición de las harinas de hongos Ab y Po dieron como resultado valores sensoriales más bajos para sabor y aroma, pero alrededor del nivel de aceptabilidad, sin diferencias significativas entre las muestras con adición de las harinas de hongo. En el caso de sabor, las muestras con 5.0 % de harinas (LF-Ab, LF-Po y MF) puntuaron por encima del nivel aceptable (3.0) mientras que las muestras control puntuaron cerca del nivel bueno (1.95 ± 0.76). En este mismo parámetro, sólo LF-Ab puntuó por encima del nivel aceptable, mientras que el resto de los tratamientos se clasificaron entre niveles buenos y aceptables. El sabor característico en los hongos es el umami, es intenso, especialmente en las muestras con harina de Ab (Phat et al., 2016), y la aceptabilidad de la salchicha dependerá de qué tan acostumbrado esté el consumidor con este sabor. En general los compuestos relacionados al sabor umami mejoran la palatabilidad en los productos salados, lo que permite reducir el contenido de sal sin una percepción negativa por parte del consumidor, además de aumentar la saciedad (Miyaki et al., 2016). Pero la incorporación de nuevos ingredientes en las carnes procesadas modifica las propiedades sensoriales y puede limitar la aceptabilidad del consumidor (Cofrades et al., 2017). Durante el almacenamiento en refrigeración, los parámetros sensoriales evaluados en muestras crudas, el color, la decoloración superficial y olor no cambiaron significativamente, lo que confirma la estabilidad del producto durante largos periodos de almacenamiento.

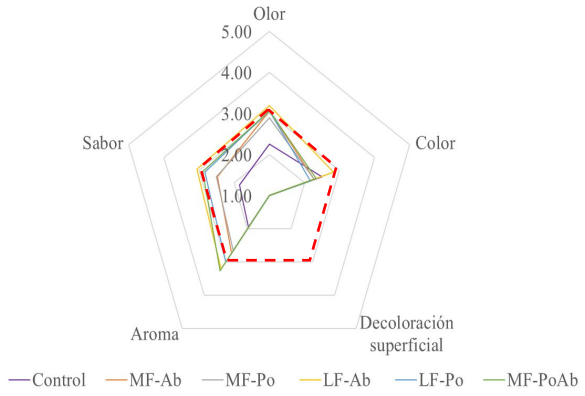


Figura 4. Resultados sensoriales de carne para salchicha Frankfurt evaluadas en el día 0.

Conclusiones

La inclusión de harinas de Ab y Po en salchichas Frankfurt reducidas en grasa y sal parece ser una estrategia factible para mejorar el perfil nutricional de estos productos, aunque las propiedades fisicoquímicas, de textura y sensoriales se vieron afectadas por la presencia de las harinas de hongo y la concentración. El perfil de proteína se mantuvo, y se incrementó el contenido de fibra, lo que hace que las harinas de Ab y Po sean un interesante sustituto de la grasa y sal, e incluso de la carne. El color se vio afectado significativamente por la inclusión de la harina de Ab, resultando en productos más oscuros, mientras que la adición de la harina Po presentó mayor impacto en la textura con embutidos más blandos y menos cohesivos. Sin embargo, las muestras con adición de las harinas de hongos se mantuvieron sensorialmente aceptables a pesar de que se percibió el fuerte sabor umami. Durante el almacenamiento en refrigeración, las muestras permanecieron prácticamente sin cambios durante los 90 días.

Referencias

A.O.C.S., 2005.Official Procedure, Approved Procedure Am 5-04. Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. American Oil Chemists' Society, Urbana, IL.

Álvarez, D.; Xiong, Y.L.; Castillo, M.; Payne, F.A.; Garrido, M.D., 2012. Textural and viscoelastic properties of pork frankfurters containing canola-olive oils, rice bran, and walnut. Meat Sci, 92, 8–15. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.012.

AOAC, 1996. Official Methods of Analysis AOAC,15th ed.; Washington, DC.

Bach, F., Helm, C. V., Bellettini, M. B., Maciel, G. M., & Haminiuk, C. W. I., 2017. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. International Journal of Food Science & Technology, 52(11), 2382-2392. https://doi.org/10.1111/ijfs.13522.

Bourne, M. C., 1966. A Classification of Objective Texture and Consistency Methods of Foods. Journal of Food Science, 31, 282–291. https//doi.org/10.1111/j.1365-2621.1966.tb03285.x

Cerón-Guevara, M. I., Rangel-Vargas, E., Lorenzo, J. M., Bermúdez, R., Pateiro, M., Rodríguez, J. A., ... & Santos, E. M., 2020. Effect of the addition of edible mushroom flours (*Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*) on physicochemical and sensory properties of cold-stored beef patties. Journal of Food Processing and Preservation, 44(3), e14351.https://doi.org/10.1111/jfpp.14351.

Cheung, P. C. K., 2013. Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. Food Science and Human Wellness, 2, 162–166. https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.001

Choi, Y.S.; Choi, J.H.; Han, D.J.; Kim, H.Y.; Lee, M.A.; Jeong, J.Y.; Kim, C.J., 2010. Effects of replacing pork back fat with vegetable oils and rice bran fiber on the quality of reduced-fat frankfurters. Meat Sci, 84, 557–563. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.012 .

Cofrades, S.; Benedí, J.; Garcimartin, A.; Sánchez-Muniz, F.J.; Jimenez-Colmenero, F., 2017. A comprehensive approach to formulation of seaweed-enriched meat products: From technological development to assessment of healthy properties. Food Res Int, 99, 1084-1094. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.029 .

Deepalakshmi, K., & Mirunalini, S., 2014. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. J Biochem Tech, 5(2), 718–726.

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H., 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. Food chemistry, 124(2), 411-421. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.077.

Fernandes, Â., Barros, L., Martins, A., Herbert, P., & Ferreira, I. C., 2015. Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate. Food Chemistry, 169, 396-400.https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.027.

Figuerola, F.; Hurtado, M.L.; Estévez, A.M.; Chiffelle, I.; Asenjo, F., 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. Food Chem, 91, 395–401. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.036 .

González-Palma, I., Escalona-Buendía, H. B., Ponce-Alquicira, E., Téllez-Téllez, M., Gupta, V. K., Díaz-Godínez, G., & Soriano-Santos, J., 2016. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. Frontiers in Microbiology, 7, Article 1099. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01099.

Henning, S.S.C.; Tshalibe, P.; Hoffman, L.C., 2016. Physico-chemical properties of reduced-fat beef species sausage with pork back fat replaced by pineapple dietary fibres and water. LWT - Food Sci Technol, 74, 92-98. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.007 .

ISO 936, 1998. International standards meat andmeat products - Determination of ash content. Geneva, Switzerland: International Organization for Standarization.

ISO 937, 1978. International standardsmeat andmeat products - Determination of nitrogen content. Geneva, Switzerland: International Organization for Standarization.

ISO, 1442, 1997. International standards meat and meat products— Determination of moisture content. Geneva, Switzerland: International Organization for Standarization.

ISO, 2012. Sensory analysis e General guidance for the selection, training and monitoring of assessors e Part 1: Selected assessors, ISO 8586:2012. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Lorenzo, J. M., Bermúdez, R., Domínguez, R., Guiotto, A., Franco, D., & Purrinos, L., 2015. Physicochemical and microbial changes during the manufacturing process of dry-cured lacón salted with potassium, calcium and magnesium chloride as a partial replacement for sodium chloride. Food Control, 50, 763-769.https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.019.

Marti-Quijal, F.J.; Zamuz, S.; Tomašević, I.; Rocchetti, G.; Lucini, L.; Marszałek, K.; … Lorenzo, J.M., 2019. A chemometric approach to evaluate the impact of pulses, Chlorella and Spirulina on proximate composition, amino acid, and physicochemical properties of turkey burgers. J SciFood Agri, 99, 3672–3680. https://doi.org/10.1002/jsfa.9595.

Mercadante, A.Z.; Capitani, C.D.; Decker, E.A.; Castro, I.A., 2010. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. Meat Science, 84, 718–726. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.031.

Miyaki, T., Retiveau-Krogmann, A., Byrnes, E., & Takehana, S., 2016. Umami increases consumer acceptability, and perception of sensory and emotional benefits without compromising health benefit perception. Journal of Food Science, 81(2), S483-S493. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13195.

Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., & De Meulenaer, B., 2012. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. Journal of agricultural and food chemistry, 60(38), 9589-9594. https://doi.org/10.1021/jf302451c .

Phat, C., Moon, B., & Lee, C., 2016. Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis, sensory evaluation, and an electronic tongue system. Food Chemistry, 192, 1068-1077. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.113 .

Pintado, T.; Herrero, A.M.; Jiménez-Colmenero, F.; Ruiz-Capillas, C., 2016. Strategies for incorporation of chia (Salvia hispanica L.) in frankfurters as a health-promoting ingredient. Meat Sci, 114, 75–84.

Ramos, M., Burgos, N., Barnard, A., Evans, G., Preece, J., Graz, M., ... & Jiménez, A., 2019. *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds. Food chemistry, 292, 176-187. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.035.

Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C., 2012. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. Food and Chemical Toxicology, 50(2), 191-197. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.056.

Salcedo-Sandoval, L.; Cofrades, S.; Ruiz-Capillas Pérez; C., Solas, M.T.; Jiménez-Colmenero, F., 2013. Healthier oils stabilized in konjac matrix as fat replacers in n-3 PUFA enriched frankfurters. Meat Sci, 93, 757–766. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.038.

Vyncke W.,1975. Evaluation of the Direct Thiobarbituric Acid Extraction Method for Determining Oxidative Rancidity in Mackerel (Scomber scombrus L.). Fette, Seifen, Anstrichmittel, 77 (6). 239-240.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Modificación del perfil lipídico en salchichas frankfurt mediante una emulsión gelificada a base de trigo sarraceno y aceite de cáñamo.

C. Botella-Martínez, J. Fernández-López, J.A. Pérez-Álvarez y M. Viuda-Martos.

Universidad Miguel Hernández. Grupo de Industrialización de Producción de Origen Animal (IPOA), Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Escuela politécnica superior de Orihuela. Orihuela, España. y e-mail: c.botella@umh.es

Resumen

La salchicha tipo frankfurt es un producto cárnico ampliamente consumido. Entre las razones que hace a este producto tan popular se encuentran, su sabor, la conveniencia y el precio bajo de las mismas. Por otro lado, este producto cárnico contiene una elevada cantidad de grasa, superando el 40% en algunas formulaciones. Debido a esta elevada cantidad de grasa, el consumidor rechaza estos productos cárnicos y en consecuencia la industria alimentaria ha de adaptarse y ofrecer productos acordes a sus necesidades y preocupaciones. Una de las estrategias de la industria cárnica para aproximarse a los productos demandados por el consumidor es el desarrollo de productos con bajo contenido en grasa o con un perfil lipídico modificado respecto a las formulaciones tradicionales. Así pues, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la sustitución de la grasa de cerdo, por una emulsión gelificada (EG) a base de harina de trigo sarraceno y aceite de cáñamo, sobre la composición química, textura y sensoriales de unas salchichas tipo frankfurt. La elaboración de las salchichas tipo frankfurt, se realizó siguiendo una fórmula tradicional, estableciéndola como control (MC). El efecto de sustituir grasa por EG se evaluó con dos tratamientos: sustitución del 75% (EG75) y del 100% (EG100). En la composición centesimal, la sustitución de grasa por las emulsiones provocó una disminución de la grasa y la proteína y un aumento de la humedad con respecto a MC y esto ocurría de una forma dependiente del grado de sustitución. Del mismo modo, se observó una disminución del contenido total de ácidos grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGMI) en las muestras EG75 y EG100 con respecto a MC, pasando de valores de AGS y AGMI en MC de 35,96 y 50,88 g/100g respectivamente a valores de 16,03 y 17,78 g/100g en EG100. Se incrementó el contenido en ácidos grasos poliinsaturados en las muestras EG75 y EG100 respecto a MC. Tras estos cambios los parámetros de oxidación lipídica no presentaron diferencias entre ninguna de las tres muestras. Los parámetros de textura analizados no mostraron diferencias significativas entre las tres muestras. Sin embargo, la aceptabilidad general de la EG100 presentó diferencias con la MC siendo superior para esta última. Estos resultados sugieren que la EG a base de trigo sarraceno y aceite de cáñamo podría ser empleada como sustituto de la grasa para desarrollar productos cárnicos más saludables, con una mejor composición de ácidos grasos y sin detrimento de propiedades tecnológicas.

Palabras clave: Emulsión gelificada, ácidos grasos poliinsaturados, pseudocereales, reducción de grasa.

Modification of the lipid profile in frankfurters with a gelled emulsion based on buckwheat and hemp oil.

Abstract

Frankfurters are a widely consumed meat product. The reasons that make this product so popular are its taste, convenience and low price. On the other hand, this meat product contains a high amount of fat, more than 40% in some formulations. Due to this high amount of fat, the consumer rejects these meat products and consequently the food industry has to adapt and offer products according to consumer's needs. One of these strategies of the meat industry to approach the products demanded by the consumer is the development of products with low fat content or with a modified lipid profile compared to traditional formulations. Thus, the objective of this work was to determine the effect of the partial and total substitution of pork fat, by a gelled emulsion (GE) based on buckwheat flour and hemp oil, on the chemical composition, physical-chemical and sensorial properties of some

frankfurter sausages. The production of frankfurters was carried out following a traditional formula, establishing it as a control (SC). The effect of replace fat for GE was evaluated with two treatments: replacement of 75% (GE75) and 100% (GE100). In the centesimal composition, fat replacement by the emulsion caused a decrease in fat and protein and an increase in moisture respect to SC depending on substitution degree. A decrease in the total content of saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated (MUFA) was observed in the samples GE75 and GE100 compared to SC. With values of SFA and MUFA in SC of 35.96 and 50.88 g/100g respectively. And values of 16.03 and 17.78 g/ 100g in GE100. The content of polyunsaturated fatty acids was increased in samples GE75 and GE100 respect to SC. After these changes, lipid oxidation parameters did not show differences between any of three samples. Texture parameters did not show significant differences between three samples. However, the general acceptability of the GE100 presented differences with SC, being higher for SC. These results suggest that GE based on buckwheat and hemp oil could be used as a fat substitute to develop healthier meat products, with a better composition of fatty acids and without detriment to technological properties.

Keywords: Gelled emulsion, polyunsaturated fatty acids, pseudocereals, fat reduction.

Introducción y/o Justificación

La carne y los productos cárnicos son importantes fuentes de proteínas de alto valor biológico conteniendo aminoácidos esenciales para la salud humana, ácidos grasos, vitaminas principalmente del grupo B, minerales esencialmente hierro y zinc de alta biodisponibilidad; por todo ello, tienen una repercusión muy significativa sobre la ingesta de nutrientes en las dietas de los países occidentales. Sin embargo, también pueden contener ácidos grasos saturados (AGS), colesterol, sal, nitritos, etc., siendo estos componentes los que, tras diversos estudios, se asocian con un aumento en el riesgo de padecer ciertas enfermedades crónicas del mundo Occidental; enfermedades cardiovasculares (ECV) y distintos tipos de cáncer como el de colon. Entre todos los componentes anteriormente citados, son los lípidos de la carne los que mayor atención han recibido a la hora de diseñar y desarrollar productos cárnicos más saludables. Múltiples estudios han relacionado el perfil lipídico de alimentos ricos en AGS con enfermedades cardiovasculares o metabólicas tales como la diabetes o arteriosclerosis (Sobczak et al., 2021). Aunque la industria cárnica intenta respetar al máximo la tradición, no cesa de investigar, desarrollar e innovar nuevos productos. El consumo de productos cárnicos ha seguido aumentado, a pesar de las recomendaciones nutricionales, e indica que esta industria está adaptándose a las exigencias de los consumidores cuyos hábitos alimentarios han cambiado, inclinándose hacia productos con marcados beneficios en la prevención de determinadas enfermedades, la contribución a la mejora de su salud y bienestar. Siguiendo esta tendencia, la industria cárnica elabora productos más saludables, mediante la reducción de aquellos componentes que son perjudiciales, la eliminación o sustitución de ciertos ingredientes y aditivos (como la grasa, la sal y nitritos), que influyen negativamente en la imagen de estos productos y en la salud de los consumidores, y/o favorecer la presencia de ciertas sustancias deseables, con efectos beneficiosos para la salud (Powell et al., 2019). Una de las estrategias que se presenta como más exitosa para el desarrollo de productos más saludables sería la reformulación de los productos cárnicos, siendo esta las más utilizada a la hora de diseñar nuevos productos cárnicos saludables, ya que es la forma más rápida al incidir directamente durante el desarrollo del producto final. Entre las estrategias más empleadas destacan aquellas que permiten una reducción del contenido graso total, del colesterol y una mejora del perfil lipídico, siendo aquellas que se enfocan en la reducción del contenido total en grasa y a la vez en la mejora del perfil lipídico, las más utilizadas. Dicho enfoque se puede llevar a cabo sustituyendo total o parcialmente la grasa animal, que se añade durante la elaboración de los productos cárnicos, por lípidos más saludables cuyas características estén más acordes con las recomendaciones nutricionales actuales como es el caso de los aceites vegetales (ricos en AGM y AGP y/o AGP n-3 de cadena larga) (Ospina-E et al., 2015). La incorporación de estos aceites a los productos cárnicos se pude realizar de forma directa, aunque es una forma de fácil aplicación, puede ocasionar problemas de oxidación, de

textura y poca capacidad de la matriz para retener los aceites incorporados dependiendo del tipo y cantidad añadida (Kim et al., 2020). Otra de las formas de introducir los aceites a las matrices cárnicas es mediante encapsulados. Si bien este procedimiento permite la protección de estos aceites frente a los procesos de oxidación lipídica, es poco eficiente para incorporar grandes cantidades en productos cárnicos (Solomando et al., 2020). En los últimos años, la comunidad científica ha mostrado un gran interés en el desarrollo de emulsiones, puesto que permiten reemplazar la grasa animal, mejorar el perfil lipídico, así como vehiculizar compuestos bioactivos (Zhang y et al., 2020; Fernández-López et al., 2021). Recientemente se han publicado diversas estrategias sobre el uso de distintas emulsiones gelificadas elaboradas con harinas y aceites vegetales en el desarrollo de productos cárnicos funcionales y saludables. Entre estas nuevas estrategias se encuentra el uso de la chía para la formación de emulsiones, en particular hidrogelificadas para la obtención de material lipídico de consistencia sólida, en la formulación de análogos de grasa en emulsiones gelificadas, para remplazar la grasa animal en la elaboración de salchichas tipo "Frankfurt low-fat" (Herrero et al., 2017) y salchichas tipo longanizas (Herrero et al., 2017; Pintado et al., 2018). En estos estudios se mostró que la sustitución total o parcial de grasa animal por emulsiones gelificadas de chía, para estabilizar diferentes cantidades de aceite de oliva en la reformulación de derivados cárnicos saludables mejoró la composición del producto final, permitiendo incluso establecer declaraciones nutricionales y propiedades saludables. En el estudio de Botella-Martínez (2018) se emplearon emulsiones gelificadas elaboradas con harina de castaña y aceite de aguacate o aceite de lino como agentes para substituir parte de la grasa en la elaboración de salchichas tipo Frankfurt. En este estudio se concluyó que la presencia de las emulsiones cárnicas reducía considerablemente el contenido de grasa de las muestras además de mejorar el perfil de ácidos grasos de las mismas. Desde el punto de vista científico-técnico, merece la pena hacer un esfuerzo por ampliar la variedad de productos que se ofertan al consumidor, incorporando nuevas gamas que permitan incrementar el consumo, haciéndolos más saludables y disminuyendo el riesgo de potenciales efectos negativos para la salud, derivados del excesivo consumo de grasa animal. Por todo ello, el objetivo de presente estudio fue (i) la evaluación de la viabilidad tecnológica de la producción de salchichas tipo frankfurt con dos niveles de sustitución de la grasa de cerdo por una emulsión gelificada a base de aceite de cáñamo y harina de trigo sarraceno; (ii) la investigación del efecto de diferentes porcentajes de sustitución (75% y 100%) sobre la composición química, propiedades texturales, perfil lipídico, oxidación lipídica y propiedades sensoriales de las salchichas.

Material y Métodos

Materiales

Para la elaboración de la emulsión gelificada se usaron: Aceite de cáñamo cuya composición es, ácido linoleico 54,44%, ácido α-linolénico 19,95%, ácido oleico 8,23%, ácido palmítico 6,17%, ácido linoleico 4,26%, ácido esteárico 2,3%, ácido ϒ-linolénico 1,62%. de Laboratorios Almond, S.L. (Murcia, España). Harina de trigo sarraceno distribuido por Biogran S.L. (Madrid, España).

Preparación de la emulsión gelificada

Se elaboró una emulsión gelificada (EG) con una composición del 47:40:10:3 de agua, aceite de cáñamo, harina de trigo sarraceno, agentes gelificantes respectivamente. El procedimiento llevado a cabo para la obtención de esta EG fue el descrito por Botella-Martínez et al. 2021. La EG se guardó en recipientes con tapa y se refrigeró a 4 ºC hasta su posterior incorporación en las salchichas tipo Frankfurt. Esta EG se elaboró por triplicado.

Preparación de los lotes de salchichas tipo Frankfurt

Se elaboraron 3 lotes de salchichas tipo Frankfurt, en la planta piloto de IPOA en la Universidad Miguel Hernández siguiendo un protocolo industrial. Uno de estos lotes fue una muestra control (MC)

elaborada siguiendo una fórmula tradicional con un contenido de grasa de cerdo del 35% y el resto (65%) carne magra de cerdo. Además, se añadieron para la elaboración de esta muestra agua (15%, en forma de hielo), almidón de patata (3%), caseinato (1,5%), cloruro de sodio (1,5%), tripolifosfato de sodio (300 mg/ Kg), nitrito de sodio (150 mg/Kg), humo líquido (0,2 /mL /Kg), nuez moscada y pimienta blanca como especias. Para la elaboración del segundo lote (EG75), se sustituyó un 75% de la grasa de la MC por la emulsión gelificada y el tercer lote (EG100) se realizó con una sustitución total de la grasa empleada en MC por la EG. Se realizaron 3 réplicas de cada elaboración en diferentes días. El proceso de elaboración se realizó en una cutter (1094-Homogeneizer, Tekator, Höganäs, Suiza), en ella se mezcló la carne con el cloruro de sodio durante 2 minutos, seguido se adicionaron el resto de ingredientes y se volvió a homogeneizar. La masa cárnica obtenida para cada lote, se embutió en tripa artificial de celulosa de 20 mm de diámetro con una embutidora de pistón EM-12 (Mainca, Granollers, Barcelona, España). Las muestras se cocieron hasta alcanzar en el centro del producto 72 ºC. Una vez frías las salchichas fueron embolsadas y guardadas en refrigeración a 4 ºC.

Caracterización de las salchichas tipo Frankfurt

- **Composición proximal**

La determinación de grasa, proteína, humedad y cenizas se realizó de los tres lotes de muestras por triplicado siguiendo los métodos de la AOAC, 2010.

- **Perfil de ácidos grasos**

Se realizó la extracción de grasa por triplicado para cada uno de los diferentes lotes por medio del método Folch et al., 1957. Tras la extracción a la fase lipídica se le sometió a una metilación siguiendo el método 969.33 de la AOAC, 2010. Los ácidos grasos metilados (AGM) se inyectaron en un equipo de cromatografía de gases HP 6890 con detector ionizador de llama y una columna capilar Suprewax-280. Las condiciones y tiempos para la determinación son los descritos por Botella-Martínez et al., 2021. Los análisis se realizaron por triplicado y se expresaron los resultados en g ácido graso/ 100 g de aceite.

El índice aterógenico (IA) y trombogénico (IT) fueron calculados siguiendo la ecuación 1 y 2 (Ec. 1 y Ec.2), desarrolladas por Ulbricht y Southgate, 1991.

$$IA = \frac{C12{:}0+(4xC14{:}0)+C16{:}0}{\Sigma AGMI+\Sigma n6+\Sigma n3} \quad \text{Ec. 1}$$

$$IT = \frac{C14{:}0+C16{:}0+C18{:}0}{(0{,}5x\Sigma MUFA)+(0{,}5x\Sigma n6)+(3x\Sigma n3)+(\Sigma n3/\Sigma n6)} \quad \text{Ec. 2}$$

La ratio hipocolesterolémico/hipercolesterolémico (h/H) fue calculado mediante la ecuación 3 (Ec. 3), proporcionada por Fernández et al., 2007.

$$h/H = \frac{C18{:}1n9+C18{:}1n7+\Sigma PUFA}{C14{:}0+C16{:}0} \quad \text{Ec. 3}$$

- **Análisis textural**

El análisis del perfil textural de los tres lotes de salchichas tipo frankfurt se realizó por quintuplicado. Las muestras fueron sometidas a dos ciclos de compresión al 75% de velocidad constante de 1 mm/s (análisis TPA). De las curvas obtenidas se calculó la dureza (N), la adhesividad (N.s), la esponjosidad (mm), la cohesividad (adimensional) y la masticabilidad (N.mm).

- **Oxidación lipídica**

La oxidación lipídica se midió por el método de Rosmini et al., 2005. Se determina la cantidad de malonaldehído (MA) que contienen las muestras al hacerlas reaccionar con ácido tiobarbitúrico. La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como mg MA/ Kg de muestra.

Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo en la Universidad Miguel Hernández, en concreto en la sala de catas de la Escuela Politécnica de Superior de Orihuela, en cabinas individuales. La cata fue de tipo hedónico con una escala de 7 puntos donde, 1: me disgusta extremadamente y 7: me gusta extremadamente. La cata fue realizada por 17 consumidores no entrenados. Se sirvieron muestras de aproximadamente 2 cm de espesor de cada uno de los tres lotes. Los panelistas evaluaron características como color, dureza, jugosidad, olor, flavor a cáñamo y aceptabilidad general.

Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias estadísticas entre las tres muestras, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA). Se vio si existían diferencias estadísticamente significativas mediante el test de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%. El análisis se realizó con el paquete SPSS software (versión 24.0, SPSS INC., Chicago, IL, USA).

Resultados y Discusión

Propiedades de la emulsión gelificada

La emulsión gelificada (EG) a base de harina de trigo sarraceno y aceite de cáñamo presentó un pH de 6,06± 0,01, contenido de proteína de 2,63± 0,02 g/100 g de muestra y una estabilidad de emulsión adecuada con poca separación entre fases tras la centrifugación. Esta EG presentó una cantidad de 10,24 ± 0,08 % de ácidos grasos saturados (AGS) y 89,77± 0,06 % de ácidos grasos insaturados (AGI). Siendo el principal ácido graso con una cantidad del 54,44% el ácido linoleico, 19,95% de α-linolénico, 8,23% de ácido oleico y 6,17% de ácido palmítico (Botella-Martínez et al., 2021).

Composición proximal de los tres lotes de salchichas

Los resultados de humead, proteína, cenizas y grasa de las salchichas tipo frankfurt analizadas se presenta en la Tabla 1. El contenido de humedad de las tres muestras presentó diferencias estadísticamente significativas (p<0,05), con unos valores entre 65,81% para la muestra con una sustitución del 100% de grasa por la EG (EG100) y 59,66% para la muestra control (MC). La cantidad de cenizas para las tres muestras fue el mismo (p>0,05). Se puede observar una reducción significativa (p<0,05) de grasa a medida que la sustitución de grasa aumenta, mostrando una disminución del 29% y del 39% respectivamente para EG75 y EG100 comparado con la MC. El contenido de proteína disminuye (p<0,05) si comparamos la MC (14,59%) con las dos muestras sustituidas EG75 (13,48%) y EG100 (13,41%), sin diferencias significativas (p>0,05) en el contenido de proteína entre estas dos últimas muestras (EG75 y EG100). De entre todos los parámetros analizados en la composición centesimal el más destacable es la reducción de grasa dado que hacen a los productos con sustitución de grasa con un menor valor energético. Comparando los resultados con otros productos cárnicos con sustitución parcial de grasa mediante emulsiones gelificadas, se obtuvieron resultados similares en la composición centesimal (Alejandre et al., 2019; dos Santos et al., 2020; Kavusen et al., 2020).

Tabla 1. Composición química de salchichas tipo Frankfurt con sustitución de grasa.

	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteína
MC	59,66±0,03^{c}	2,34±0,15^{a}	20,75±0,28^{a}	14,59±0,25^{a}
EG75	64,87±0,10^{b}	3,11±1,47^{a}	14,78±0,09^{b}	13,48±0,22^{bc}
EG100	65,81±0,02^{a}	2,39±0,04^{a}	12,69±0,10^{c}	13,41±0,15^{c}

Resultados expresados comos g/100g. MC: muestra control de salchicha tipo frankfurt realizada con una formula tradicional. EG75: muestra con un 75% de EG como sustituto de grasa. EG100: muestra con un 100% de sustitución de grasa con la EG. Para cada parámetro seguido de la misma letra (a-c) no hay diferencias significativas según el test de Tukey's HSD post-hoc (p >0.05).

Perfil textural de los tres lotes de salchichas tipo Frankfurt

La textura de los productos cárnicos es una propiedad muy importante para la aceptación de los consumidores. A parte, es uno de los parámetros que más se pueden ver afectados a la hora de emplear sustitutos de grasa ya que las propiedades texturales para la grasa de cerdo y las emulsiones gelificadas no son las mismas. En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos del análisis de TPA de las muestras. En dicha tabla, se puede observar que la adhesividad, cohesividad y masticabilidad no presentaron diferencias significativas entre las tres muestras (p>0,05). Sin embargo, en la dureza, gomosidad y esponjosidad sí que se presentaron diferencias significativas (p<0,05) entre los tres lotes de muestras. Los valores de dureza y gomosidad fueron inferiores (p<0,05) para la EG100 respecto a las otras dos muestras (MC y EG75). Esto podría deberse a la composición química presentada por las muestras, ya que la muestra EG100 fue la que presentó menor cantidad de grasa haciendo al producto menos denso (RPE 1924/2006). Solo la elasticidad en la muestra EG75 (0,33± 0,05) difirió (p<0,05) del control (0,26± 0,02) y de EG75 (0,25± 0,04) y aunque significativamente fue diferente cuantitativamente fue muy pequeño. En otros estudios en los cuales se ha realizado una sustitución de grasa total o parcial en frankfurt, la propiedad que más se ha visto afectada fue la dureza. La dureza para estas muestras presenta tanto un aumento como disminución de la misma al realizar la sustitución de grasa de cerdo por EG. Estas propiedades texturales están principalmente relacionadas con las propiedades texturales de las emulsiones gelificadas utilizadas como sustitutos (Herrero et al., 2017; de Souza Paglarini et al., 2019; Pintado, Ruiz-Capillas y Herrero. 2019; Lucas-Gonzalez et al., 2020).

Tabla 2. Perfil textural de las salchichas tipo frankfurt.

	Dureza	Adhesividad	Esponjosidad	Cohesividad	Gomosidad	Masticabilidad
MC	87.11±8.86^{a}	-0.67±0.34^{a}	0.26±0.02^{b}	0.78±0.04^{a}	67.78±5.74^{a}	17.36±2.12^{a}
EG75	89.86±20.73^{a}	-0.49±0.32^{a}	0.33±0.05^{a}	0.76±0.03^{a}	68.07±13.54^{a}	22.82±7.66^{a}
EG100	63.22±9.72^{b}	-0.91±0.34^{a}	0.25±0.04^{b}	0.81±0.02^{a}	51.02±7.05^{b}	12.92±3.27^{a}

Todas las propiedades son adimensionales excepto la dureza que viene en newton y la adhesividad en newton por segundos. MC: muestra control de salchicha tipo frankfurt realizada con una formula tradicional. EG75: muestra con un 75% de EG como sustituto de grasa. EG100: muestra con un 100% de sustitución de grasa con la EG. Para cada parámetro seguido de la misma letra (a-c) no hay diferencias significativas según el test de Tukey's HSD post-hoc (p >0.05).

Perfil lipídico y parámetros nutricionales de los tres lotes de salchichas

Tabla 3. Perfil lipídico y parámetros nutricionales de las salchichas sustituidas.

% Ácidos grasos (n=3)	MC	EG75	EG100
C 6:0	0.01 ± 0.00^{aL}	0.02 ± 0.00^{aN}	0.02 ± 0.00^{aN}
C 8:0	0.02 ± 0.00^{aL}	0.04 ± 0.00^{aN}	0.03 ± 0.00^{aN}
C 10:0	0.06 ± 0.01^{aK}	0.04 ± 0.00^{bN}	0.02 ± 0.00^{cN}
C 12:0	0.08 ± 0.00^{aK}	0.05 ± 0.00^{bN}	0.02 ± 0.00^{cN}
C 13:0	ND	ND	0.02 ± 0.00^{N}
C 14:0	1.27 ± 0.02^{aE}	0.67 ± 0.01^{bJ}	0.37 ± 0.00^{cJ}
C 15:0	0.07 ± 0.00^{aK}	0.05 ± 0.00^{bN}	0.03 ± 0.00^{cN}
C 16:0	22.92 ± 0.03^{aB}	14.39 ± 0.09^{bC}	9.96 ± 0.13^{cC}
C16:1trans	0.42 ± 0.00^{aG}	0.22 ± 0.00^{bL}	0.14 ± 0.00^{cL}
C 16:1cis	2.21 ± 0.01^{aD}	1.04 ± 0.00^{bH}	0.54 ± 0.01^{cI}
C 17:0	0.38 ± 0.01^{aG}	0.25 ± 0.00^{bL}	0.17 ± 0.00^{cL}
C 17:1	0.34 ± 0.00^{aH}	0.19 ± 0.00^{bM}	0.07 ± 0.04^{cM}
C 18:0	10.94 ± 0.04^{aC}	7.07 ± 0.02^{bE}	4.44 ± 0.07^{cD}
C 18:1cis	46.71 ± 0.10^{aA}	23.53 ± 0.10^{dB}	15.56 ± 0.44^{cB}
C 18:1 tra	0.10 ± 0.00^{bJ}	1.34 ± 0.00^{aG}	0.92 ± 0.16^{aG}
C 18:2 (n9)	11.56 ± 0.01^{cC}	35.09 ± 0.01^{bA}	45.62 ± 0.06^{aA}
C 18:2(n9)	0.09 ± 0.01^{cJ}	2.31 ± 0.00^{bF}	3.30 ± 0.00^{aE}
C 18:3 (n9)	0.68 ± 0.01^{cF}	10.81 ± 0.00^{bD}	15.38 ± 0.00^{aB}
C18:3 (n6)	ND	0.84 ± 0.00^{bI}	1.22 ± 0.01^{aF}
C 20:0	0.20 ± 0.00^{cI}	0.61 ± 0.00^{bJ}	0.75 ± 0.02^{aH}
C 20:1	1.10 ± 0.03^{aE}	0.67 ± 0.00^{bJ}	0.55 ± 0.00^{cI}
C20:2	0.54 ± 0.01^{aF}	0.32 ± 0.00^{bK}	0.24 ± 0.01^{cK}
C20:3	0.31 ± 0.01^{aH}	0.25 ± 0.01^{bcL}	0.20 ± 0.01^{cK}
C20:5	ND	0.24 ± 0.00^{bL}	0.32 ± 0.01^{aJ}
C 24:0	ND	ND	0.20 ± 0.03^{K}
n3	0.98 ± 0.02^{cG}	11.30 ± 0.17^{bE}	15.90 ± 0.07^{aD}
n6	12.19 ± 0.05^{cE}	38.56 ± 0.01^{bC}	50.39 ± 0.05^{aC}
n-6/n-3 ratio	12.39 ± 0.01^{aE}	3.41 ± 0.03^{bG}	3.17 ± 0.05^{cF}
Σ AGS	35.96 ± 0.04^{aC}	23.17 ± 0.00^{bD}	16.03 ± 0.01^{cD}
Σ AGI	64.05 ± 0.03^{cA}	76.85 ± 0.07^{bA}	84.06 ± 0.22^{aA}
Σ AGMI	50.88 ± 0.02^{aB}	26.98 ± 0.04^{bD}	17.78 ± 0.18^{cD}
Σ AGPI	13.17 ± 0.01^{cD}	49.87 ± 0.02^{bB}	66.28 ± 0.13^{aB}
Σ AGI/ ΣAGS	0.37 ± 0.01^{cH}	2.15 ± 0.07^{bG}	4.13 ± 0.02^{aF}
IA	0.44 ± 0.01^{aH}	0.22 ± 0.00^{bH}	0.14 ± 0.00^{cG}
IT	1.02 ± 0.04^{aG}	0.33 ± 0.00^{bH}	0.18 ± 0.00^{cG}
h/H	2.48 ± 0.03^{cF}	4.96 ± 0.02^{bF}	8.01 ± 0.07^{aE}

Los resultados vienen expresados como g/100g. ND: no detectado. AGS: ácidos grasos saturados. AGI: ácidos grasos insaturados. AGMI: ácidos grasos monoinsaturados. AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. Letras minúsculas (a–c) se refiere a la comparación del mismo ácido graso entre diferentes muestras, mientras las letras mayúsculas (A-N) se refiere a la comparación de diferentes ácidos grasos en la misma muestra. Los resultados seguidos de la misma letra minúscula o mayúscula no existen diferencias significativas de acuerdo al test de Tuke's HSD post-hoc (p>0,05).

En la Tabla 3 se muestra el impacto de la sustitución del 75% y del 100% de la grasa de cerdo por la emulsión gelificada sobre el perfil lipídico y los parámetros nutricionales de los tres lotes de salchichas tipo frankfurt. Se detectaron diferencias (p<0,05) en el perfil de ácidos grasos de las salchichas en función del nivel de sustitución de grasa de cerdo sustituida. Esto era lo esperado dado que los aceites

vegetales son ricos en ácidos grasos insaturados tanto ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) como poliinsaturados (AGPI). En la muestra control (MC) se identificaron 21 ácidos grasos, entre los cuales el ácido graso palmítico (C16: 0), ácido esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) constituyen aproximadamente el 92% de los ácidos grasos totales. Lo que concuerda con la composición de ácidos grasos de la grasa de la panceta de cerdo publicada por otros autores (Ospina-E et al., 2010). La sustitución de la grasa de cerdo por la EG, se observó una disminución del ácido oleico, palmítico y esteárico junto con un aumento en el ácido graso linoleico. Además, el ácido linolénico (C18: 3) aumentó con valores de un 10% para la muestra EG75 y un 15% para la muestra EG100. Todos estos cambios en la composición de ácidos grasos son mayores a medida que aumentan los niveles de sustitución de grasa por la EG. En el nivel más alto de sustitución de grasas (EG100), el ácido linoleico presentó el mayor porcentaje, seguido del ácido oleico y linolénico (sin diferencias entre ellos, $p>0.05$), ácido palmítico y ácido esteárico. También se observó una reducción de la cantidad de ácidos grasos saturados (AGS) a medida que la sustitución de grasa es mayor. Pasando de un 35,96% de AGS de la muestra MC a un 16,03% de AGS para la muestra EG100. Por todo esto las salchichas EG75 y EG100 podrían considerarse "reducidas en grasas saturadas" dado que la disminución es de más del 25% según la normativa europea (Öztürk-Kerimoğlu, Urgu-Öztürk y Serdaroglu, 2021). Todos estos cambios en el perfil lipídico son debidos al perfil presentado por la EG, la cual tenía como principal AGMI el ácido oleico y los principales AGPIs los ácidos linoleico y linolénico (Botella-Martínez et al., 2021). Por este motivo, el contenido de AGMI disminuyó y el contenido de AGPI aumentó a medida que la sustitución de grasa de cerdo por la EG aumentaba. Debido a estos cambios también podrían etiquetarse a las salchichas sustituidas como "ricas en omega-3" ya que contenían más de 0,6 g de ácido α-linolénico por 100 g de producto (1-1,95 g de ácido α-linolénico por 100 g de salchicha frankfurt).

Tanto la relación AGPI/AGS como la proporción de ácidos grasos n-6/n-3 son parámetros nutricionales ampliamente estudiados debido a su asociación con enfermedades cardiovasculares. Se recomienda que la relación AGPI/AGS sea superior a 0,4 y la relación n-6/n-3 inferior a 4 (da Silva et al., 2021). Se puede observar en la Tabla 3 que la muestra control no cumple los requisitos nutricionales sin embargo ambas muestras sustituidas EG75 y EG100 si cumplen la recomendación para la relación n-6/n-3. Existe una asociación de la aparición de diversas enfermedades a valores elevados tanto del índice aterogénico (IA) y el índice trombogénico (IT) (de Souza Paglarini at al., 2019). La sustitución de grasas por la EG redujo estos factores de riesgo cardiovascular ya que disminuyeron tanto IA como el IT a medida que la sustitución era mayor con diferencias significativas ($p<0,05$). Por otro lado, valores más altos del índice hipocolesterolémico/hipercolesterolémico (h/H) están relacionados con el metabolismo del colesterol y se consideran también beneficiosos para la salud cardiovascular (Fernández et al., 2014) y viceversa, por ello la salchicha "menos saludable" en este aspecto fue la MC y la muestra EG100 la más saludable con diferencias entre las tres muestras ($p<0,05$).

Oxidación lipídica

Como se puede observar en la Figura 1, todas las muestras presentaron un nivel de oxidación lipídico bajo con valores que oscilan entre 0,09 y 0,29 mg malonaldehído (MA)/kg de muestra, sin diferencias entre ellas ($p>0.05$). Este resultado es positivo dado que los aceites vegetales por su composición rica en AGPI son muy susceptibles a la oxidación lipídica. Por ello, aunque las muestras EG75 y EG100 presentaron una elevada cantidad de AGPI (Tabla 3) no influyó en un aumento de la oxidación lipídica ($p>0,05$) respecto a la MC. Este efecto podría deberse a un efecto protector de la matriz del gel en la cual podrían estar las gotas de aceite encapsulado en su interior (Öztürk-Kerimoğlu, Urgu-Öztürk, Serdaroglu, 2021). Alejandre et al., 2019 obtuvo un resultado similar para la oxidación lipídica en hamburguesas de ternera en las que la grasa se reemplazó totalmente con una EG elaborada con aceite

de microalgas y extracto de rama de endrino. También sugirieron que el menor contenido de grasa de las hamburguesas reformuladas podría explicar este control de la oxidación de lípidos.

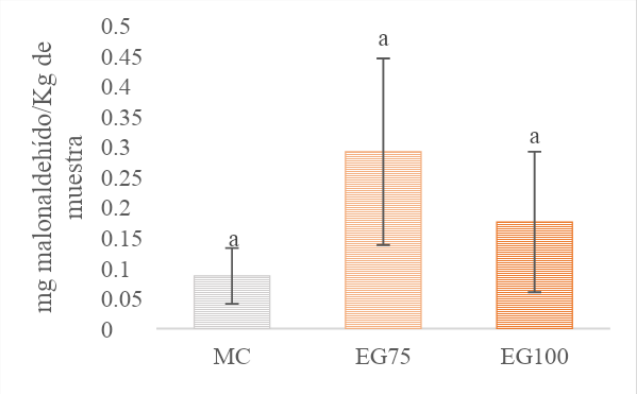


Figura 1. Oxidación lipídica de las salchichas tipo frankfurt sustituidas. MC: muestra control de salchicha tipo frankfurt realizada con una formula tradicional. EG75: muestra con un 75% de EG como sustituto de grasa. EG100: muestra con un 100% de sustitución de grasa con la EG. Para cada parámetro seguido de la misma letra (a-c) no hay diferencias significativas según el test de Tukey's HSD post-hoc (p >0.05).

Análisis sensorial

La calidad sensorial es una característica importante a tener en cuenta dado que la modificación de la grasa en los productos cárnicos puede ejercer un efecto negativo. La Figura 2, muestra los resultados de la calidad sensorial de las muestras sustituidas lipídicamente en cuanto a color, olor a cáñamo, flavor a cáñamo, sabor salado, jugosidad, dureza y aceptabilidad.

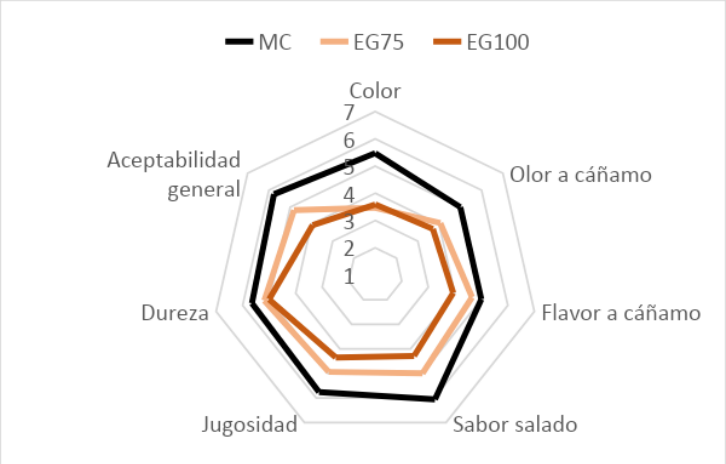


Figura 2. Análisis sensorial de los tres lotes de salchichas. MC: muestra control de salchicha tipo frankfurt realizada con una formula tradicional. EG75: muestra con un 75% de EG como sustituto de grasa. EG100: muestra con un 100% de sustitución de grasa con la EG.

Los valores de sabor a cáñamo, jugosidad y dureza fueron similares (p> 0.05) para todas las muestras. Los resultados para el olor a cáñamo y sabor salado siguieron el mismo patrón: solo la muestra EG100 obtuvo valores más bajos (p<0.05) respecto a la MC. El color fue el atributo que más varió en la reformulación de las salchichas; en este caso, las muestras EG75 y EG100 presentaron valores más bajos (p<0.05) que el control. Esto podría deberse al color verde que presentó la propia EG y que al incluirla en el producto cárnico en mayor porcentaje variara la percepción de color negativamente por parte de los panelistas. La mayoría de los autores informaron características sensoriales no deseadas en

diferentes tipos de productos cárnicos en los que el reemplazo de grasa animal por una EG se realizó en altos porcentajes (de Souza Paglarini at al., 2019; dos Santos et al., 2020; da Silva et al., 2021).

Conclusiones

Desde un punto de vista tecnológico, estos resultados sugieren que la emulsión gelificada a base de trigo sarraceno y aceite de cáñamo podría ser empleada como sustituto de la grasa a concentraciones elevadas para desarrollar productos cárnicos más saludables, con una mejor composición de ácidos grasos. Sin embargo, dada la importancia del color del producto como criterio de compra por parte del consumidor, se debería trabajar con una sustitución a menor concentración. A pesar del incremento de ácidos grasos poliinsaturados que se observan en las muestras con sustitución de grasa del 75% y del 100% por la EG no se vio incrementada su susceptibilidad oxidativa dado que los valores TBARs no difirieron entre los tres lotes de muestras. Las salchichas Frankfurt EG75 y EG100 pueden catalogarse como saludables y como fuente de omega-3.

Bibliografía

Alejandre, M., Ansorena, D., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., Astiasaran, I., 2019. Influence of a gel emulsion containing microalgal oil and a blackthorn (*Prunus spinosa* L.) branch extract on the antioxidant capacity and acceptability of reduced-fat beef patties. Meat Sci, 148, 219-222. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.05.022.

AOAC, 2010. Official methods of analysis of AOAC International, 18th edition. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC, USA.

Botella-Martínez, C. 2018. "Determinación de la composición química, propiedades fisicoquímicas, tecnofuncionales y actividad antioxidante de la harina de castaña. Posterior aplicación de la misma a un producto cárnico cocido tipo salchicha frankfurt". Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.

Botella-Martínez, C., Pérez-Álvarez, J.A., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., 2021. Assessment of chemical, physico-chemical and lipid stability properties of gelled emulsions elaborated with different oils Chia (*Salvia hispanica L.*) or Hemp (*Cannabis sativa L.*) and pseudocereals. Foods, 10, 1463.

Dias, M.F., Guimarães, A.S., Benevenuto Jr, A.A., Silva, V.R.O., Fontes, P.R., Ramos, A.d.L.S., Ramos, E.M., 2021. Canola and olive oil gelled emulsions as pork fat replacers in beef burgers. Br Food J, Vol. ahead-of-print No. ahead-of-print. https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2021-0119

Fernández, C.E., Vasconcelos, M.A., Ribeiro, M., Sarubbo, L.A., Andrade, S.A.C., Filho, A.B., 2014. Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. Food Chem, 160, 67-71. htpps://doi,org/ 10.1016/j.foodchem.2014.03.055.

Fernández, M., Ordóñez, J.A., Cambero, I., Santos, C., Pin, C., de la Hoz, L., 2007. Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. Food Chem, 101(1), 107-112. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.006.

Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J.A., 2021. Quinoa and chia products as ingredients for healthier processed meat products: technological strategies for their application and effects on the final product. Curr Opin Food Sci, 40, 26-32. https://doi.org/ 10.1016/j.cofs.2020.05.004.

Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, ;226(1):497-509. PMID: 13428781

Herrero, A.M., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., Carmona, P., Jiménez-Colmenero, F., 2017. Infrared spectroscopy used to determine effects of chia and olive oil incorporation strategies on lipid structure of reduced-fat frankfurters. Food Chem, 221, 1333-1339. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.022.

Kavusan, H.S., Serdaroglu, M., Nacak, B., Ipek, G., 2020. An approach to manufacture of fresh chicken sausages incorporated with black cumin and flaxseed oil in water gelled emulsion. Food Sci Anim Resour, 40, 426-443. https://doi.org/10.5851/KOSFA.2020.E23.

Lucas-González, R., Roldán-Verdú, A., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M., 2020. Assessment of emulsion gels formulated with chestnut (*Castanea sativa* M.) flour and chia (*Salvia hispanica* L) oil as partial fat replacers in pork burger formulation. J Sci Food Agric 100, 1265-1273. https://doi.org/10.1002/jsfa.10138.

Ospina-E, J.C., Cruz-S, A., Pérez-Álvarez, J.A., 2010. Development of combinations of chemically modified vegetable oils as pork backfat substitutes in sausages formulation. Meat Sci, 84, 491-497. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.003.

Ospina−E, J.C., Rojano, B., Ochoa, O., Pérez−Álvarez, J.A., Fernández−López, J., 2015. Development of frankfurter−type sausages with healthy lipid formulation and their nutritional, sensory and stability properties. Eu J Lipid Sci Technol, 117(1), 122-131. https://doi.org/ 10.1002/ejlt.201400157.

Öztürk-Kerimoğlu, B., Urgu-Öztürk, M., Serdaroglu, M., 2021. A new inverse olive oil emulsion plus carrot powder to replace animal fat in model meat batters. LWT- Food Sci Tech, 135, 110044. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110044.

Pintado, T., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C., 2018. Posibilidades del empleo de emulsiones gelificadas de chía o avena como sustitutos de grasa animal en productos cárnicos más saludables. Eurocarne, 264, 83-94. ISSN 1132-2675.

Pintado, T., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A.M., 2019. New lipid materials based on chia emulsion gels: Application in meat products. J Biomed Sci, 18, 13215-13218. https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.18.003088.

Powell, M.J., Sebranek, J.G., Prusa, K.J., Tarté, R., 2019. Evaluation of citrus fiber as a natural replacer of sodium phosphate in alternatively-cured all-pork Bologna sausage. Meat Sci, 157, 107883.

Regulación Parlamento Europeo 1924/2006, 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. Official Journal of the European Union, 2006. OJ, L12, 3–8.

Rosmini, M., Perlo, F., Pérez-Alvarez, J., Pagán-Moreno, M., Gago-Gago, M., López-Santoveña, F. Aranda-Catalá, V., 2005. TBA test by an extractive method applied to pate. Meat Sci, 42, 103–110. https://doi.org/10.1016/0309-1740(95)00010-0.

dos Santos, M., Munekata, P.E.S., Pateiro, M., Magalhães, G.C., Barretto, A.C.S., Lorenzo, J.M., Pollonio, M.A.R., 2020. Pork skin-based emulsion gels as animal fat replacers in hot-dog style sausages LWT-Food Sci Tech, 109845.https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109845.

Shin, D. Lee, H.J., Lee, D., Jo, C., Choe, J., 2020. Fat replacement in chicken sausages manufactured with broiler and old laying hens by different vegetable oils. Poult Sci, 99, 2811-2818. https://doi.org/ 10.1016/j.psj.2020.01.008

da Silva, S.L., Amaral, J.T., Ribeiro, M., Sebasião, E.E., Vargas, C., de Lima Franzen, F., Scheneider, G., Lorenzo, J.M., Fries, L.L.M., Cichoki, A.J., Campagnol, P.C.B., 2019. Fat replacement by oleogel rich in oleic acid and its impact on the technological, nutritional, oxidative, and sensory properties of Bologna-type sausages. Meat Sci, 149, 141-148. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.11.020.

Sobczak, A.I.S., Pitt, S.J., Smith, T.K., Ajjan, R.A., Stewart, A.J., 2021. Lipidomic profiling of plasma free fatty acids in type-1 diabetes highlights specific changes in lipid metabolism. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 1866, 158823, https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158823.

Solomando, J.C., Antequera, T., Perez-Palacios, T., 2020. Lipid digestion products in meat derivatives enriched with fish oil microcapsules. J Funct Foods, 68, 103916, https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103916.

de Souza, C., de Figueiredo, G., Honório, A.R., Mokarzel, L., da Silva Vidal, V.A., Ribeiro, A.P.B., Pollonio, M.A.R., 2019. Functional emulsion gels as pork back fat replacers in Bologna sausage. Food Struct, 20, 100-105. https://doi-org/10.1016/j.foostr.2019.100105.

Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T., 1991. Coronary heart disease: Seven dietary factors. The Lancet, 338, 985-992. https://doi-org/10.1016/0140-6736(91)91846-m

Zhang, T., Xu, J., Zhang, Y., Wang, X., Lorenzo, J.M., Zhong, J., 2020. Gelatins as emulsifiers for oil-in-water emulsions: Extraction, chemical composition, molecular structure, and molecular modification. Trends Food Sci Technol, 106, 113-131. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.005.

Sesión 11:

Postcosecha y procesado de productos vegetales.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Efectos del tratamiento en precosecha con melatonina sobre los parámetros de calidad en granada 'Mollar de Elche'.

F. Garrido [1], J.M. Lorente-Mento[1], D. Valero[2], M. Serrano[1]

[1] Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3,2, 03312, Orihuela, Alicante, fgarrido@umh.com
[2] Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3,2, 03312, Orihuela, Alicante.

Resumen

La granada (*Punica granatum* L.) es un fruto que presenta interesantes propiedades nutricionales y funcionales al contar con una amplia variedad de compuestos bioactivos que pueden verse reducidos, al igual que otros parámetros de calidad, tras largos períodos de almacenamiento. La melatonina se ha reconocido recientemente como una hormona capaz de regular diversas funciones fisiológicas en las plantas. En este trabajo se emplearon tres concentraciones diferentes de melatonina (0,1 mM, 0,3 mM y 0,5 mM) aplicadas como tratamiento precosecha para evaluar su efecto sobre la calidad de la granada 'Mollar de Elche'. Para ello, se investigaron los posibles efectos que los tratamientos podrían tener sobre distintos parámetros de calidad (sólidos solubles, acidez titulable y firmeza) y compuestos fitoquímicos beneficiosos para la salud (antocianinas y polifenoles) durante un almacenamiento de 60 días a 10 ºC. Todas las concentraciones presentaron mejoras en los parámetros estudiados con respecto al control, siendo las granadas del tratamiento con la menor concentración (0,1 mM) las que mostraron mayor contenido fenólico, de antocianinas y de sólidos solubles, así como una mayor firmeza y acidez titulable. Se concluye que el tratamiento en campo con melatonina, mediante espray foliar, sirve para mantener de forma mejorada ciertos parámetros de calidad en la granada 'Mollar de Elche' tras un almacenamiento de dos meses a 10 ºC. Esta estrategia podrá ser de interés en otras variedades y/o frutales, siendo necesaria su continua investigación para el estudio de aspectos distintos a los aquí presentados.

Palabras clave: antiocianinas, fenoles, acidez, sólidos solubles totales, firmeza

Effects of pre-harvest treatment with melatonin on quality parameters in 'Mollar de Elche' pomegranate

Abstract

Pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit has interesting nutritional and functional properties due to a wide array of bioactive compounds, although they can be reduced, as well as other quality parameters, after long storage periods. Melatonin has recently been recognized as a plant hormone capable of regulating various physiological functions in plants. In this work, three different concentrations of melatonin were used (0.1 mM, 0.3 mM and 0.5 mM) and applied as pre-harvest treatment to evaluate their effect on quality traits of 'Mollar de Elche' cultivar. The effects of these treatments on different quality parameters (soluble solid content, titratable acidity and firmness) and phytochemical compounds beneficial to health (anthocyanins and polyphenols) during storage of 60 days at 10ºC were investigated. All melatonin concentrations improved the studied parameters with respect to control fruit, being the pomegranates from the treatment with the lowest concentration (0.1 mM) those that showed the highest phenolic, anthocyanin and soluble solids content, as well as greater firmness and titratable acidity. Thus, foliar spray melatonin application maintained an improved quality parameters and bioactive compounds in 'Mollar de Elche' pomegranate after storage for two months at 10 ºC. This strategy could be of interest in other pomegranate cultivars and/or other fruit species, although further research is needed.

Keywords: anthocyanins, phenolics, acidity, total soluble solids, firmness

Introducción y justificación

La granada (*Punica granatum* L.) es un fruto subtropical que pertenece a la familia Punicaceae (Holland, Hatib y Bar- Ya'akov, 2009). En España la variedad más cultivada es 'Mollar de Elche', la cual está caracterizada por presentar un alto contenido de sólidos solubles totales, baja acidez titulable, un sabor agradable, así como por poseer semillas pequeñas y blandas fáciles de comer (Nuncio-Jàuregui et al., 2014). Generalmente, el fruto de la granada es destacado por ser una buena fuente de carbohidratos, minerales, fibra y compuestos activos como la vitamina C y los polifenoles, entre los que destacan la punicalagina, el ácido elágico, galotaninos y antocianinas, los cuales son conocidos por actuar como antioxidantes naturales (Pareek, Valero y Serrano, 2015). En bibliografía se ha reportado que en los arilos de la granada los sólidos solubles totales y las antocianinas incrementan constantemente durante la maduración, mientras se produce una disminución de la acidez. Además, durante la maduración hay cambios significativos en los parámetros fitoquímicos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante, lo cual depende de la variedad, condiciones ambientales y de las prácticas hortofrutícolas empleadas (Nuncio-Jàuregui et al., 2014).

Desde el punto de vista comercial, la pérdida de atributos de calidad, externos e internos, tras la recolección de granada es indeseable, ya que los consumidores rechazan estos frutos, siendo un importante reto el preservar su calidad visual y nutricional. Entre las diferentes variables determinantes, se ha demostrado que la temperatura de almacenamiento es uno de los principales factores que influyen en su vida útil. Además, recientes tratamientos postcosecha, con los ácidos oxálico y salicílico, han sido empleados para preservar la calidad de la granada tras almacenamiento a temperaturas inferiores a 4ºC (Ehteshami et al., 2020). Las condiciones usuales de almacenamiento para las distintas variedades de granada involucran temperaturas entre 5-7ºC en condiciones de atmósfera regular, pudiendo durar el almacenamiento entre 2 y 3 meses. Además, es importante que los frutos se recolecten en su óptimo estado de maduración, pues en este punto tendrán un mayor valor nutricional, funcional y sensorial (Ehteshami et al., 2020).

Por otro lado, la melatonina (N-acetil-5-methoxytryptamina) es una molécula pleiotrópica con numerosas acciones fisiológicas y celulares. A nivel celular, es reconocida su actividad antioxidante, aunque también se ha demostrado su papel protector contra estreses bióticos y/o abióticos y su función como regulador en el enraizamiento, crecimiento y otras características morfogenéticas, pues los cambios en los niveles de melatonina son capaces de controlar los ritmos biológicos de la planta y ejercer una acción moduladora en la expresión de ciertos genes (Arnao y Hernández-Ruiz, 2015). Además, publicaciones recientes indican un papel de la melatonina en la maduración de los frutos, siendo la mayoría de estos estudios sobre tratamientos postcosecha (Xu, Chen y Kang, 2019; Arnao y Hernández-Ruiz, 2020). Así, el tratamiento de melatonina a 0,1 mM de melocotones en postcosecha fue capaz de reducir la pérdida de peso y la tasa de respiración, mantener la firmeza, la cantidad total de sólidos solubles, así como el contenido de ácido ascórbico durante 7 días de almacenamiento a 25-28ºC, con un incremento en las actividades enzimáticas antioxidantes de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD), y ascorbato peroxidasa (APX) (Gao et al., 2016). Así mismo, tratamientos postcosecha con melatonina se han empleado para retrasar el proceso de maduración en plátanos (Hu et al., 2017), mangos (Liu et al., 2020) y nectarinas (Bal, 2021).

Sin embargo, los estudios sobre el tratamiento en precosecha con melatonina son más escasos y los resultados obtenidos no son concluyentes. Así, en cereza, la melatonina aplicada en el momento del endurecimiento del hueso redujo la maduración (Tijero, Muñoz y Munné-Bosch., 2019), mientras que el efecto contrario se encontró en tomate (Liu et al., 2016). Por otra parte, en albaricoque, el tratamiento con melatonina durante el desarrollo del fruto en el árbol no afectó al proceso de maduración, aunque sí aumentó la calidad de los frutos, tanto en la recolección como durante la conservación (Medina-Santamarina et al., 2021). No obstante, hasta la fecha no hay publicaciones científicas sobre el efecto de la melatonina en granada.

Dada la importancia comercial que tiene el conseguir alargar lo máximo posible el estado de maduración en frutos de granada preservando sus propiedades funcionales y sensoriales, en este

trabajo se han empleado tres concentraciones distintas de melatonina (0,1, 0,3 y 0,5 mM), aplicadas al granado de la variedad 'Mollar de Elche' mediante espray foliar con el objetivo de evaluar su efecto sobre distintos parámetros de calidad de la granada (contenido fenólico, antocianinas, acidez titulable, firmeza y sólidos solubles) en el momento de la recolección y durante un almacenamiento de 30 y 60 días a 10 ºC.

Materiales y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

La investigación se realizó con granados (*Punica granatum* L.), de la variedad 'Mollar de Elche', plantados en una finca comercial de Elche (Alicante, España) en 2019. Se utilizaron 6 árboles para cada tratamiento: control y melatonina (comprada de Sigma-Aldrich, Madrid) a concentraciones 0,1, 0,3 y 0,5 mM. Los árboles recibieron 4 aplicaciones durante su período de crecimiento: la primera se aplicó cuando el fruto llegó al 20% de su tamaño, la segunda al 50%, la tercera al 85% y la cuarta tres días antes de la recolección. En cada aplicación, se trató cada árbol mediante pulverización foliar con una mochila manual con 3 L de la disolución correspondiente.

La recolección de la granada 'Mollar de Elche' se llevó a cabo cuando los frutos alcanzaron su estado de maduración comercial. Se seleccionaron un total de 45 frutos por tratamiento, que se llevaron al laboratorio inmediatamente tras la recolección. Los frutos de cada tratamiento se dividieron en 3 lotes de 15 frutos, etiquetados como 'Día 0' (que se analizaron el día de la recolección), 'M1' y 'M2' (que se analizaron después de 30 y 60 días de almacenamiento, respectivamente, a 10ºC y 85% de Humedad Relativa (HR)).

Después de 0, 30 y 60 días de conservación se analizaron parámetros de calidad de interés desde el punto de vista comercial en la granada: firmeza, cantidad de sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT), contenido fenólico total y concentración de antocianinas.

Determinaciones analíticas

- **Firmeza**

La firmeza individual de cada fruto se midió con el analizador de textura TX-XT2i (Stable microsystems, Godalming, Reino Unido). Para ello, se aplicó una fuerza (N) encargada de causar una deformación (mm) del 5% en el diámetro del fruto (García-Pastor et al., 2020 a). Los resultados se expresaron como la media ± error estándar (SD) de la relación entre la fuerza aplicada y la distancia de deformación (N mm^{-1}).

- **Sólidos solubles totales**

De las 15 granadas, de cada tratamiento y repetición, se tomaron al azar 3 lotes de 5 granadas que se pelaron, extrajeron los arilos, y exprimieron de forma manual usando pañuelos de tela, para obtener una muestra homogénea de zumo. Esto permite obtener 3 repeticiones de zumo para cada tratamiento y día de almacenaje. De este zumo, se midieron los SST por duplicado utilizando el refractómetro digital Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokio, Japón) a 20ºC. Los resultados se expresaron como la media ± SD en gramos de SST por cada 100 g de arilos (g 100 g^{-1}).

- **Acidez titulable**

La acidez titulable fue determinada por duplicado usando el mismo zumo que para el análisis de SST. Para ello, se tomó 1 mL de zumo que se diluyó en 25 mL de agua destilada. Usando esta dilución se realizó una titulación con 0,1 N NaOH hasta pH 8,1 en el valorizador automático 785 DMP Titrino, Metrohm. Los resultados se expresaron como la media ± SD de los gramos de ácido málico equivalente (AME) por cada 100 g de peso fresco (g 100 g^{-1}).

- **Contenido de fenoles totales**

La extracción de fenoles totales se realizó con 5 g de arilos y 10 mL de una dilución agua:metanol (1:4) que contenía 2 mM NaF para inactivar la actividad polifenol oxidasa y prevenir la degradación fenólica como describieron Serrano et al. (2009). La cuantificación se realizó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron como la media ± SD en miligramos de ácido gálico equivalente por cada 100 g (mg 100 g^{-1}).

- **Concentración de antocianinas totales**

La concentración de antocianinas se determinó como reportaron Serrano et al. (2005). Los resultados se expresaron como la media ± SD en miligramos de cianidín-3-glucósido equivalente por cada 100 g (mg 100 g^{-1}).

Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media ± SD de tres réplicas. Para las determinaciones analíticas de los datos se realizó un análisis de varianza estilo ANOVA. Las fuentes de variación para los distintos análisis fueron el tiempo de almacenamiento y las concentraciones de los tratamientos. Para determinar si había diferencias significativas (p<0,05) entre los distintos tratamientos, se compararon las medidas de las réplicas usando un test de Tukey. Los cálculos y gráficos fueron desarrollados con el programa SigmaPlot versión 11.0 para Windows.

Resultados y Discusión

Resultados

La firmeza de las granadas tratadas con melatonina 0,3 mM, fue significativamente mayor que la del control en el día 0, pero no se observó una diferencia significativa en la firmeza de las granadas tratadas con melatonina 0,3 y 0,5 mM respecto al control. Después de 30 días de conservación, los valores de firmeza de las granadas tratadas con 0,1, 0,5 y 0,3 mM de melatonina (22, 33±1,01, 21,60±1,18 y 21,58±0,93 N mm^{-1}, respectivamente) sí que mostraron ser significativamente mayores que los del control (17,88±0,64 N mm^{-1}), aunque no hubo diferencias significativas en los valores de firmeza entre los distintos tratamientos de melatonina. Además, estas diferencias se mantuvieron hasta los 60 días de almacenamiento a 10 ºC (Fig. 1).

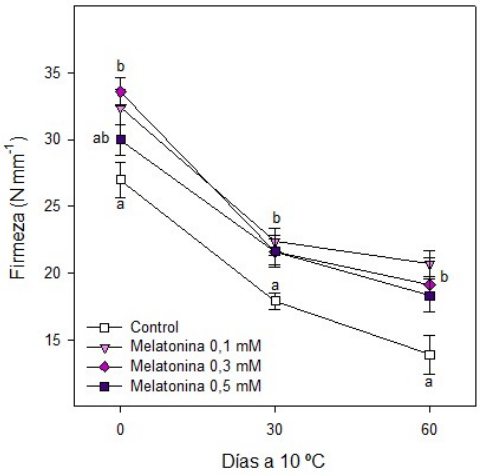


Figura 1. Evolución de la firmeza en las granadas de los árboles control y tratados con melatonina tras 0, 10 y 60 días de almacenamiento a 10 ºC. Los datos son representados como la media±SD de 3 repeticiones de 5 frutos. Las letras diferentes muestran diferencias significativas (p<0,05) para cada día de muestreo.

La acidez titulable no mostró diferencias significativas entre el control y los distintos tratamientos en el día 0. No obstante, las diferencias fueron apareciendo a lo largo del tiempo, llegándose a obtener una diferencia significativa de la acidez titulable entre el control y el tratamiento con melatonina 0,1 mM a los 30 días de almacenamiento y con las demás concentraciones a los 60 días. A lo largo del almacenamiento, el control mostró una disminución en los niveles de acidez titulable con respecto a los del día 0, mientras que en los arilos de las granadas tratadas con cualquier concentración de melatonina se mantuvieron estables los niveles de acidez, aunque sin diferencias significativas entre las distintas concentraciones (Fig. 2A).

El contenido de SST fue significativamente mayor el día 0 en los arilos de las granadas tratadas con melatonina 0,1 mM (15,30±0,13 g 100 g^{-1}) que en el control (14,50±0,16 g 100 g^{-1}). No obstante, para las concentraciones de 0,3 y 0,5 mM no se encontraron diferencias significativas con el control. En relación con el día 0, los arilos de las granadas tratadas con melatonina 0,1 mM aumentaron significativamente el contenido en SST durante los primeros 30 días de conservación (Fig. 2B). Además, tras 30 días de almacenamiento, los niveles de SST en los arilos de las granadas tratadas con melatonina 0,1 mM fueron significativamente mayores a los de las granadas tratadas con melatonina 0,5 mM. Durante este almacenamiento los arilos de las granadas control y tratadas con melatonina 0,3 mM, también presentaron una diferencia significativa en el contenido de SST respecto a las concentraciones 0,1 mM y 0,5 mM de melatonina. El contenido de sólidos solubles totales aumentó en todas las muestras conforme se prolongaba el tiempo de almacenamiento. Además, tras la conservación de 60 días, las diferencias entre los tratamientos 0,5 mM y 0,3 mM de melatonina dejaron de ser significativas.

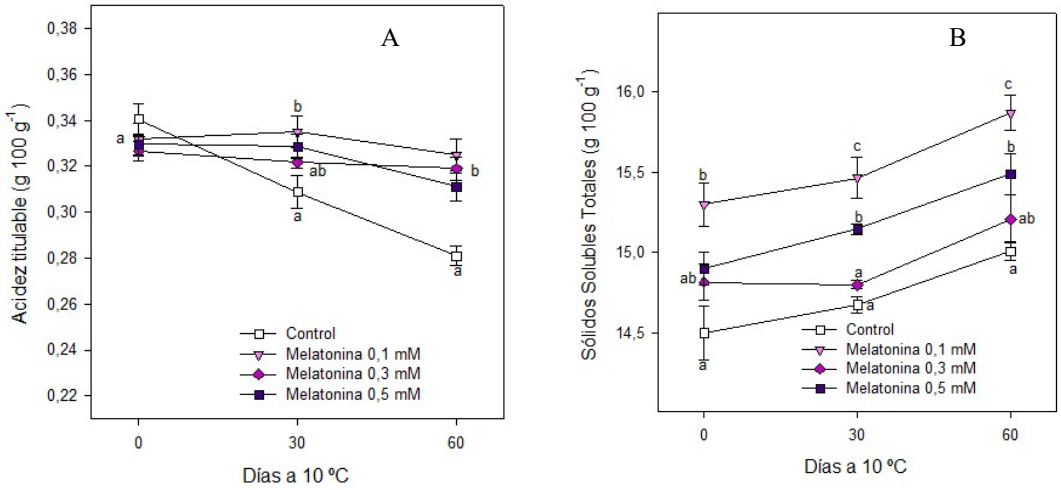


Figura 2. Evolución de la acidez titulable (A) y sólidos solubles totales (B) en las granadas de los árboles control y tratados con melatonina tras 0, 10 y 60 días de almacenamiento a 10 ºC. Los datos son representados como la media±SD de 3 repeticiones de 5 frutos. Las letras diferentes muestran diferencias significativas (p<0,05) para cada día de muestreo.

El contenido de fenoles totales en el día 0, mostró ser significativamente mayor en las extracciones obtenidas de los arilos de las granadas tratadas con melatonina 0,1, 0,3 y 0,5 mM, respecto al control, aunque no se observaron diferencias significativas en la cantidad de fenoles totales entre los distintos tratamientos de melatonina. Con el aumento del tiempo de almacenamiento, todas las muestras (incluida el control) presentaron un incremento en el contenido de fenoles. No obstante, con el almacenamiento de 30 días, continuaron sin observarse diferencias significativas entre los distintos tratamientos de melatonina. Por otro lado, los arilos tratados con melatonina 0,1, 0,3 y 0,5 mM presentaron un incremento significativo en el contenido fenólico total entre los 30 y 60 días de conservación pasando de 72,04±2,18, 68,67±3,69, y 69,34±4,81 mg 100 g^{-1}, respectivamente, en el día 30 a valores de 90,07±3,35, 81,84±3,99, y 84,11±2,98 mg 100 g^{-1}, respectivamente, en el día 60 (Fig.

3A). Al igual que sucedió con el almacenamiento de 30 días, tras 60 días de conservación no se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre las extracciones obtenidas de los arilos tratados con las distintas concentraciones de melatonina.

Finalmente, los niveles de antocianinas en el día 0 no mostraron valores significativamente diferentes entre ninguna de las extracciones obtenidas de las granadas tratadas con melatonina y el control. A pesar de esto, las diferencias significativas en el contenido de antocianinas totales de las granadas tratadas con melatonina 0,1, 0,3 y 0,5 mM y el control aparecieron a los 30 días de almacenamiento y se mantuvieron con el tiempo tras 60 días de conservación. Durante los primeros 30 días de conservación, se encontró un aumento significativo, respecto al día 0, en el contenido de cianidina-3-glucósido equivalente en los arilos tratados con melatonina 0,1, 0,3 y 0,5 mM, que pasaron de tener un contenido de 17,00±0,39, 14,99±0,41, y 15,33±0,81 mg 100 g^{-1}, respectivamente, en el día 0 a valores de 24,20±0,74, 20,51±0,98, y 21,83±2,04 mg 100 g^{-1}, respectivamente, en el día 30. Además, tras 60 días de almacenamiento los arilos tratados con una concentración de melatonina 0,1 mM presentaron una diferencia significativa en el contenido de antocianinas totales respecto a todos los demás tratamientos (Fig. 3B).

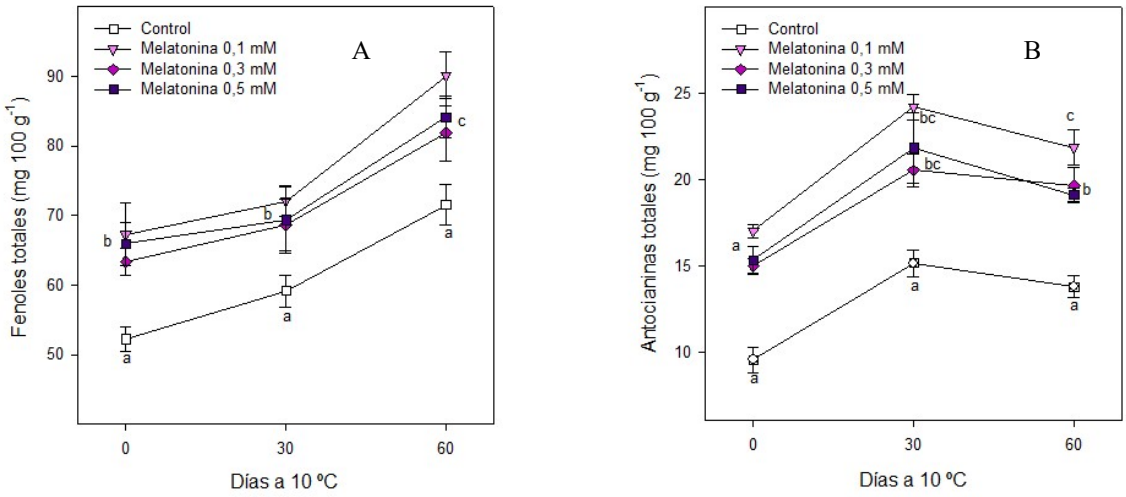


Figura 3. Evolución del contenido de fenoles totales (A) y antocianinas totales (B) en las granadas de los árboles control y tratados con melatonina tras 0, 10 y 60 días de almacenamiento a 10ºC. Los datos son representados como la media±SD de 3 repeticiones de 5 frutos. Las letras diferentes muestran diferencias significativas (P<0,05) para cada día de muestreo.

Discusión

La granada 'Mollar de Elche' es muy apreciada por los consumidores por su alto contenido en azúcares y baja acidez, aspectos que le confieren un sabor dulce, siendo también muy aromática. No obstante, los arilos presentan un color rojo pálido en comparación con otras variedades cultivadas en España, como 'White', 'CG8', 'Katirbasi' o 'Wonderful' (Fernandes et al., 2018) u otros cultivares tunecinos, turcos, croatas o iraníes (Pareek, Valero y Serrano, 2015; Radunić et al., 2015; Li et al., 2015; Cano-Lamadrid et al., 2018), depreciando su valor comercial en los mercados internacionales, que prefieren los cultivares de color más rojo. Los resultados de la presente investigación contribuirían a incrementar el beneficio de este cultivo ya que las granadas de los árboles tratados con melatonina presentaron arilos con un mayor contenido de antocianinas y, por tanto, con un color rojo más intenso (García-Pastor et al., 2020 b) que los controles en la cosecha y durante el almacenamiento, mostrando una estimulación de la biosíntesis de antocianinas mediante el tratamiento con melatonina.

La firmeza, el color de la piel y de los arilos, y los niveles de SST y AT en los arilos son los principales responsables de la calidad de las granadas (Nuncio-Jàurengui et al., 2014; Pareek, Valero y

Serrano, 2015; Valero et al., 2015). Por tanto, la mayor firmeza y SST encontrados en el momento de la recolección en las granadas de los árboles tratados con melatonina, con respecto a los controles, muestran que tenían unos atributos de calidad más altos. Además, los aumentos en los SST y las disminuciones de la firmeza y de la acidez durante la conservación muestran la evolución normal del proceso de maduración postcosecha de la granada 'Mollar de Elche' y otros cultivos de granada (Sayyari et al., 2016; García-Pastor et al., 2020 a). Los aspectos mencionados anteriormente se retrasaron con los tratamientos con melatonina. Los SST y la AT son parámetros de calidad importantes que afectan el dulzor y la acidez, respectivamente, y contribuyen al sabor de la fruta. Por tanto, el aumento de los SST y la reducción de la AT en los arilos de las granadas durante el almacenamiento llevan a incrementar la relación SST/AT, que se aprecia organolépticamente como fruta sobre madurada sin la frescura, jugosidad y sabor requeridos por los consumidores (Valero y Serrano, 2010; Pareek., Valero y Serrano, 2015, Valero et al., 2015; García-Pastor et al., 2020 b). Así, teniendo en cuenta la evolución de todos estos parámetros de calidad (principalmente las disminuciones en la firmeza del fruto y AT en los arilos), se puede establecer que el período máximo de almacenamiento a 10 °C de las granadas control, con calidad óptima para el consumo, fue de 30 días, mientras que este período se extendió hasta los 60 días en las granadas de los árboles tratados con melatonina. De hecho, los valores de firmeza de los frutos y la AT de los arilos de las granadas de todos los árboles tratados con melatonina después de 60 días de almacenamiento fueron incluso más altos que en los controles después de 30 días de almacenamiento. Además, como no se observaron diferencias significativas en estos parámetros entre los tratamientos de melatonina 0,1, 0,3 y 0,5 mM, se puede concluir que la aplicación de la dosis 0,1 mM podría ser suficiente para fines prácticos.

Por otra parte, la granada tiene una amplia gama de compuestos bioactivos, siendo los más importantes los fenoles (entre los que se encuentran antocianinas, taninos hidrolizables, flavonoides y ácido ascórbico) presentes en concentraciones elevadas en comparación con otras frutas de la dieta mediterránea. No obstante, atendiendo a las diferencias entre variedades de granada, a la maduración del fruto, a las prácticas culturales y a las condiciones ambientales, se han reportado diferencias en la concentración de compuestos fenólicos (Radunić et al., 2015; Li et al., 2015; Boussaa et al., 2019). Estos compuestos bioactivos tienen capacidad antioxidante y son responsables de los efectos beneficiosos para la salud atribuidos al consumo de la granada (Faria y Calhau, 2011). Los resultados de este trabajo muestran que los tratamientos con melatonina incrementaron las concentraciones de compuestos fenólicos totales y de antocianinas totales en el momento de la recolección y durante el almacenaje. Por lo tanto, estos tratamientos aumentarían los efectos beneficiosos de la granada para la salud, ya que los compuestos fenólicos, incluidas las antocianinas, son una amplia gama de metabolitos secundarios que presentan efectos preventivos en distintas enfermedades crónicas y relacionadas con la edad como la hipertensión, la obesidad, o la diabetes, así como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y oncológicas (Mattioli et al., 2020; Tarangon y Moreno, 2020; Luo et al., 2021).

No hay trabajos previos disponibles en la literatura sobre el efecto del tratamiento con melatonina en los compuestos bioactivos de la granada y existe poca información sobre este aspecto en otras especies de frutas. No obstante, se ha establecido que el tratamiento con melatonina 0,1 mM en las plantas de tomate aumentó la cantidad de compuestos antioxidantes, como el licopeno, el β-caroteno, los fenoles totales y los flavonoides, así como la actividad antioxidante cuando las plantas se cultivaron en condiciones de estrés por lluvia ácida (Debnath et al., 2018). Por otro lado, en cerezos, el tratamiento con 0,05 o 0,1 mM de melatonina aumentó las concentraciones totales de fenoles, flavonoles, antocianinas y ácido ascórbico en el momento de la cosecha (Xia et al., 2020). Sin embargo, los efectos de los tratamientos con melatonina en postcosecha sobre el aumento de los compuestos bioactivos de los frutos se han abordado en más especies de frutas. Por ejemplo, en la ciruela 'Santa Rosa', el tratamiento por inmersión postcosecha con melatonina 0,1 mM condujo a niveles más altos de ácido ascórbico, fenoles totales y actividad antioxidante durante el almacenamiento en comparación con los controles (Bal et al., 2019), así como en fresas tratadas con 0,1 o 1 mM de melatonina (Liu et al., 2018). Además, el tratamiento de la nectarina con melatonina 0,25, 0,5 y 1 mM durante 30 min y del melocotón con 0,1 mM durante 10 min minimizó las pérdidas fenólicas durante el almacenamiento

a 1 °C (Gao et al., 2016, Gao et al., 2018). En cerezas el tratamiento por inmersión con melatonina 0,1 mM aumentó el contenido de antocianinas durante el almacenamiento debido a una sobreexpresión de dos genes clave que codifican enzimas involucradas en las últimas etapas de la biosíntesis de las antocianinas (Miranda et al., 2020). Además, específicamente en la granada 'Malas Saveh', Aghdam et al. (2020) han informado de que el tratamiento postcosecha con melatonina 0,1 mM conduce a un mayor contenido de antocianinas y fenoles durante el almacenamiento a 4 ºC, debido a una mayor actividad de la fenilalanina amoniacal liasa (PAL), primera enzima involucrada en la vía fenilpropanoide.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo permiten concluir que el tratamiento precosecha mediante pulverización foliar con melatonina, logró retrasar la pérdida de ciertos parámetros de calidad externos e internos, así como aumentar el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante en el momento de la recolección y tras dos períodos de almacenamiento de 30 y 60 días a 10 ºC, sobre la variedad de granada 'Mollar de Elche'. Todos estos hechos pueden repercutir de forma positiva en el valor comercial y nutricional del fruto al aumentar su calidad organoléptica y funcional. Concretamente la concentración de melatonina 0,1 mM fue la que presentó mejores resultados al retrasar la pérdida de firmeza e incrementar significativamente el contenido de sólidos solubles totales y antocianinas con el paso del tiempo. También se puede concluir que la aplicación de melatonina puede ser una herramienta útil para retrasar el proceso de maduración postcosecha de frutos de granada y prolongar su vida útil en un mes aplicando un almacenamiento de 10ºC, pues tras 60 días de almacenamiento las granadas tratadas mostraron un valor más óptimo de los parámetros de calidad que las control tras 30 días de almacenamiento. Por tanto, esta investigación podría servir como punto de partida para el futuro estudio de la aplicación en precosecha de distintas concentraciones de melatonina con el fin de mejorar distintos parámetros de calidad y/o aumentar la vida útil comercial en otras variedades de granada y/o frutos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del proyecto RTi2018-09966-B-100 por el Ministerio de Ciencia e Innovación y los Fondos FEDER de la Unión Europea.

Bibliografía

Aghdam, M.S., Luo, Z., Li, L., Jannatizadeh, A., Fard, J.R., Pirzad, F., 2020. Melatonin treatment maintains nutraceutical properties of pomegranate fruits during cold storage. Food Chem. 303, 125385. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125385

Arnao, M., Hernández-Ruiz, J., 2015. Functions of melatonin in plants: a review. J. Pineal Res. 59, 133-150. 10.1111/jpi.12253

Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2020. Melatonin in flowering, fruit set and fruit ripening. Plant Reprod. 33, 77-87. https://doi.org/10.1007/s00497-020-00388-8

Bal, E., 2019. Physicochemical changes in 'Santa Rosa' plum fruit treated with melatonin during cold storage. J. Food Meas. Charact. 13, 1713-1720. https://doi.org/10.1007/s11694-019-00088-6

Bal, E., 2021. Effect of melatonin treatments on biochemical quality and postharvest life of nectarines. J. Food Meas. Charact. 15, 288-295. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00636-5

Boussaa, F., Zaouay, F., Burlo-Carbonell, F., Nuncio-Jàuregui, N., Gmati, M., El Arbi, B., Melgarejo, P., Hernandez, F., Mars, M., 2019. Combined effects of cropping system and harvest date determine quality and nutritional value of pomegranate fruits (*Punica granatum* L. cv. Gabsi). Sci. Hortic. 249, 419-431. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.007

Cano-Lamadrid, M., Galindo, A., Collado-González, J, Rodríguez, P., Cruz, Z. N., Legua, P., Burló, F., Morales, D., Carbonell-Barrachina, A., Hernández, F., 2018. Influence of deficit irrigation and crop load on the yield and

fruit quality in Wonderful and 'Mollar de Elche' pomegranates. J. Sci. Food Agric. 98, 3098-3108. https://doi.org/10.1002/jsfa.8810

Debnath, B., Hussain, M., Li, M., Lu,n X., Sun, Y., Qiu, D., 2018. Exogenous melatonin improves fruit quality features, health promoting antioxidant compounds and yield traits in tomato fruits under acid rain stress. Molecules. 23, 1868. https://doi.org/10.3390/molecules23081868

Ehteshami, S., Abdollahi, F., Ramezanian, A., Rahimzadeh, M., Mirzaalian, A., 2020. Maintenance of quality and bioactive compounds of cold stored pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit by organic acids treatment. Food Sci. Technol. Int. 0, 1–1. 10.1177/1082013220940466

Faria, A., Calhau, C., 2011. The bioactivity of pomegranate: Impact on health and disease. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 51, 626-634. https://doi-org.publicaciones.umh.es/10.1080/10408391003748100

Fernandes, L., Pereira, J.A., Lopéz-Cortés, I., Salazar, D., González-Álvarez, J., Ramalhosa, E., 2017. Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. Eur. Food Res. Technol. 243, 1799-1814. Doi: 10.1007/s00217-017-2884-4

Gao, H., Lu, Z., Yang, Y., Wang, D., Yang, T., Cao, M., Cao, W., 2018. Melatonin treatment reduces chilling injury in peach fruit through its regulation of membrane fatty acid contents and phenolic metabolism. Food Chem. 245, 659-666. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.008

Gao, H., Zhang, Z.K., Chai, H.K., Cheng, N., Yang, Y., Wang, D.N., Yang, T., Cao, W., 2016. Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit. Postharvest Biol. Technol., 118, 103–110. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.03.006.

García-Pastor, M.E., Serrano, M., Guillén, F., Giménez, M.J., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P.J., 2020 a. Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. J. Sci. Food Agric. 100, 145-153. https://doi.org/10.1002/jsfa.10007

García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M., 2020 b. The effects of salicylic acid and its derivatives on increasing pomegranate fruit quality and bioactive compounds at harvest and during storage. Front. Plant Sci. 11,668. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00668

Holland D, Hatib K., Bar-Ya'akov I., 2009. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. Hortic. Rev. 35, 127–191. https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch2

Hu, W., Yang, H., Tie, W.W., Yan, Y., Ding, Z., Liu, Y., Wu, C., Wang, J., Reiter, R.J., Tan, D.X., Shi, H.T., Xu, B.Y., Jin, Z.Q., 2017. Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality. J Agric. Food Chem. 65, 9987-9904. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03354

Li, X., Wasila, H., Liu, L., Yuan, T., Gao, Z., Zhao, B., Ahmad, I., 2015. Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. Food Chem. 175, 575-584. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.003

Liu, S., Huang, H., Huber, D.J., Pan, Y., Shi, X., Zhang, Z., 2020. Delay of ripening and softening in 'Guifei' mango fruit by postharvest application of melatonin. Postharvest Biol. Technol., 163, 111136. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111136.

Liu, J., Zhang, R., Sun, Y., Liu, Z., Jin,W., Sun, Y., 2016. The beneficial effects of exogenous melatonin on tomato fruit properties. Sci. Hortic. 207, 14-20. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.003.

Liu, C.H., Zheng, H.H., Sheng, K. L., Liu, W., Zheng, L., 2018. Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. Postharvest Biol. Technol. 139, 47-55. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.016

Luo, J., Si, H., Jia, Z., Liu, D., 2021. Dietary anti-aging polyphenols and potential mechanisms. Antioxidants. 10, 283, 1-20. https://doi.org/10.3390/antiox10020283

Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., Silva, P., 2020. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. Molecules. 25(17), 3809. https://doi.org/10.3390/molecules25173809

Medina-Santamarina, J., Zapata, P.J., Valverde, J.M., Valero, D., Serrano, M., Guillén, F., 2021. Melatonin treatment of apricot trees leads to maintenance of fruit quality attributes during storage at chilling and non-chilling temperatures. Agronomy, 11, 917. https://doi.org/10.3390/agronomy11050917

Miranda, S., Vilches, P., Suazo, M., Pávez, L., García, K., Méndez, M.A., González, M., Meisel, L-A.; Defilippi, B.G., del Pozo, T., 2020. Melatonin triggers metabolic and gene expression changes leading to improved quality traits of two sweet cherry cultivars during cold storage. Food Chem. 319, 126360. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126360

Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, Á., Carbonell-Barrachina, Á., Hernández, F., Hernández, F., 2014. Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as a ected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. Sci. Hortic. 165, 181-189. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.021

Pareek, S., Valero, D., Serrano, M., 2015. Postharvest biology and technology of pomegranate. J. Sci Food Agric. 95, 2360-2379. https://doi.org/10.1002/jsfa.7069

Radunić, M., Jukić Špika, M., Goreta Ban, S., Gadžě, J., Díaz-Pérez, J.C., Maclean, D., 2015. Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. Food Chem. 177, 53-60. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.102

Sayyari, M., Aghdam, M.S., Salehi, F., Ghanbari, F., 2016. Salicyloyl chitosan alleviates chilling injury and maintains antioxidant capacity of pomegranate fruits during cold storage. Sci. Hortic. 211, 110-117. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.08.015

Serrano, M., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D., 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. J. Agric. Food Chem. 57, 3240–3246. https://doi.org/10.1021/jf803949k

Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. J. Agric. Food Chem. 53, 2741–2745 https://doi.org/10.1021/jf0479160

Tarangon, E., Moreno, J.J., 2020. Polyphenols and taste 2 receptors. Physiological, pathophysiological and pharmacological implications. Biochem. Pharmacol. 114086. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114086.

Tijero V., Muñoz, P., Munné-Bosch, S., 2019. Melatonin as an inhibitor of sweet cherries ripening in orchard trees. Plant Physiol. Biochem. 140, 88-95. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.007

Valero, D., Mirdehghan, S. H., Sayyari, M., Serrano, M., 2015. Vapor treatments, chilling, storage, and antioxidants in pomegranates. In Processing and Impact on Active Components in Food. 189-196. Accademic Press, Elsevier, USA. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00023-8

Valero, D., Serrano, M., 2010. Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality. Ed Boca Raton: CRC Press; 288 p. https://doi.org/10.1201/9781439802670

Xia, H., Shen, Y., Shen, T., Wang, X., Zhang, X., Hu, P., Liang, D., Lin, L., Deng, H., Wang, J., Deng, Q., Lv, X., 2020. Melatonin accumulation in sweet cherry and its influence on fruit quality and antioxidant properties. Molecules, 25(3), 753. https://doi.org/10.3390/molecules25030753

Xu, T., Chen, Y., Kang, H.Y, 2019. Melatonin is a potential target for improving post-harvest preservation of fruits and vegetables. Front. Plant Sci., 10, 1388. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01388

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

La proteína antifúngica PeAfpA: optimización de su producción biotecnológica y aplicación en patosistemas postcosecha

C. Ropero, J.F Marcos y P. Manzanares

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda. Agustín Escardino, 46980, Paterna (Valencia), cropero@iata.csic.es

Resumen

La proteína antifúngica PeAfpA de *Penicillium expansum* presenta gran interés agroalimentario debido a su elevada estabilidad y potente actividad antifúngica frente a un amplio rango de hongos fitopatógenos. A pesar de los elevados rendimientos de producción en *P. expansum*, su fitopatogenicidad y su capacidad de producción de patulina resaltan la importancia de optimizar la producción de PeAfpA a través de biofactorías seguras. En este trabajo se han evaluado distintas estrategias biotecnológicas con las que optimizar la producción de PeAfpA en *Penicillium chrysogenum*. La expresión heteróloga del gen de PeAfpA bajo el control de su propio promotor *afpa* ha permitido la correcta secreción y procesado de la proteína en *P. chrysogenum*. La comparación de la cinética de producción a 3, 5, 7 y 10 días respecto a la cepa silvestre *P. expansum* CMP-1 resalta la existencia de un patrón de producción diferencial, que a tiempos cortos es ligeramente superior en la cepa de *P. chrysogenum*. Además, la purificación de PeAfpA mediante cromatografía de intercambio catiónico ha permitido identificar la secreción simultánea de las proteínas PAFB y PAFC en los sobrenadantes líquidos de la cepa sobreproductora. Por otro lado, se ha evaluado la generación de versiones quiméricas de PeAfpA con las que incrementar su rendimiento de producción y actividad antifúngica, para lo que se diseñó una versión dimérica y dos versiones quiméricas basadas en su combinación con la proteína Sca de *Penicillium digitatum*. Sin embargo, ninguno de los transformantes de *P. chrysogenum* fueron capaces de sintetizar las proteínas diseñadas. Finalmente, se ha evaluado el efecto protector de PeAfpA frente a la infección causada por *P. digitatum* y *P. italicum* en limones.

Palabras clave: proteínas antifúngicas, postcosecha, hongo filamentoso, limón, producción biotecnológica

The antifungal protein PeAfpA: optimization of its biotechnological production and application in different post-haverst pathosystems entered

Abstract

The antifungal protein PeAfpA from *Penicillium expansum* shows great agri-food interest due to its high stability and potent antifungal activity towards a wide range of phytopathogenic fungi. Despite the high yields reported in *P. expansum*, its phytopathogenicity and its ability to secrete patulin highlights the necessity to optimize PeAfpA production in biofactories regarded as safe. In this work several biotechnological strategies have been applied in order to optimize PeAfpA production in *Penicillium chrysogenum*. Heterologous expression of PeAfpA under the control of its own promoter *afpa* led to the correct secretion and processing of the protein in *P. chrysogenum*. Likewise, monitoring of PeAfpA production after 3, 5, 7 and 10 days of incubation in comparison to the natural producer *P. expansum* CMP- 1 showed a different pattern of production with a slightly higher yield in *P. chrysogenum* at short times. Furthermore, PeAfpA purification by cationic exchange chromatography enabled the identification of both PAFB and PAFC antifungal proteins in the supernatant of the PeAfpA-overproducing *P. chrysogenum* strain. Alternatively, quimeric protein production has been evaluated as a strategy to improve PeAfpA yield and antifungal activity. A dimeric protein and two quimeric combinations based on the fusion with the Sca anionic protein from *Penicillium digitatum* were designed for their bioproduction in *P. chrysogenum*. Nevertheless, none of the transformants were able to synthetize the designed proteins. Finally, *in vivo* protective assays were carried out in order to evaluate the effect of PeAfpA against *P. digitatum* and *P. italicum* infection in lemon fruits.

Keywords: antifungal proteins, post-harvest, filamentous fungus, lemon, biotechnological production

Introducción

Las infecciones causadas por hongos patógenos y la presencia de hongos micotoxigénicos representan un importante riesgo para la salud humana, la producción vegetal y la seguridad alimentaria. En la producción de cítricos destacan las infecciones producidas por los hongos fitopatógenos *Pencillium digitatum* y *Penicillium italicum*, causantes de los fenómenos de podredumbre verde y azul (Palou et al., 2014). Sin embargo, el uso continuado y, en diversos casos, incorrecto de los fungicidas químicos ha promovido la aparición de cepas resistentes (Sánchez-Torres y Tuset, 2011). Existe, por tanto, una necesidad urgente de desarrollar nuevas moléculas antifúngicas eficaces, inocuas y con modos de acción diferentes a los ya descritos.

Las AFPs (*Antifungal Proteins*) secretadas por hongos filamentosos son considerados agentes de biocontrol potenciales en post-cosecha. Las AFPs son proteínas secretadas de aproximadamente 50 aminoácidos, ricas en cisteínas, catiónicas y con una estructura compacta estabilizada por puentes disulfuro, lo que les confiere gran estabilidad. Asimismo, presentan gran interés biotecnológico debido a su elevada especificidad, estabilidad y amplio espectro antifúngico en el rango micromolar frente a los principales hongos patógenos de plantas y causantes de alteraciones de los alimentos (Hegedüs y Marx, 2013; Delgado et al., 2016).

Los hongos filamentosos presentan un amplio repertorio de AFPs en sus genomas, agrupables en tres clases filogenéticas distintas (A, B y C). En el hongo fitopatógeno de frutos de hueso *P. expansum* se ha descrito la codificación de un total de tres proteínas antifúngicas, correspondientes a cada una de las clases filogenéticas: PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC. De entre las mismas, la proteína PeAfpA presenta especial interés en agroalimentación debido a su potente capacidad antifúngica frente a hongos fitopatógenos y productores de micotoxinas, incluido su hongo productor *P. expansum* (Garrigues et al., 2018). Asimismo, se ha descrito la capacidad de PeAfpA de proteger los frutos de naranja de la podredumbre verde causada por *P. digitatum*, inhibir la infección de *Botrytis cinerea* en plantas y hojas de tomate y controlar la infección de *P. expansum* en manzanas (Gandía et al., 2020; Garrigues et al., 2018).

La futura utilización agroalimentaria de las AFPs requiere de factorías seguras, eficientes y económicamente viables con las que permitir su producción a gran escala. De entre los sistemas de expresión evaluados, es destacable la producción de distintas AFPs utilizando hongos como biofactorías (Garrigues et al., 2018; Huber et al., 2018; Holzknecht et al., 2020). En el caso de la proteína PeAfpA, su purificación ha sido llevada a cabo, con rendimientos elevados, a partir de la cepa nativa CMP-1 de *P. expansum*, hongo micotoxigénico productor natural de PeAfpA (Gandía et al., 2020). Sin embargo, la fitopatogenicidad y la capacidad de producción de patulina de *P. expansum* señalan la importancia de optimizar la producción de PeAfpA a través de biofactorías seguras. Por tanto, el objetivo de este trabajo es contribuir en la optimización de la producción biotecnológica de la proteína PeAfpA utilizando *P. chrysogenum* como factoría biológica, así como abordar la generación de nuevas AFPs quiméricas en la mejora de sus propiedades y rendimientos de producción. Finalmente, se ha evaluado la aplicación *in vivo* de PeAfpA en nuevos patosistemas postcosecha de cítricos.

Material y Métodos

Cepas, medios y condiciones de cultivo

Para los ensayos de producción de AFPs se han utilizado las cepas *P. expansum* CECT 20906 (CMP-1) y el transformante sobreproductor de PeAfpA *P. chrysogenum* PcMG0052. La cepa *P. chrysogenum* Δ*paf* se utilizó como cepa parental para las transformaciones genéticas. En los ensayos de infección *in vivo* se utilizaron las cepas de *P. digitatum* CECT20796 (aislado PHI26) y *P. italicum* (aislado PHI1). Todas las cepas fueron crecidas en medio sólido Potato Dextrose Agar (PDA, Difco) durante 5-7 días a 25 ºC. Las esporas se recogieron por rascado, se dispersaron en agua estéril, se

filtraron para eliminar restos de micelio y se contabilizaron con cámara cuentaglóbulos. Los transformantes generados para la producción de las versiones quiméricas de PeAfpA fueron crecidos en medio sólido PDA o medio líquido Potato Dextrosa Broth (PDB, Scharlau) suplementados con 25 µg/mL de geneticina. Para la producción de las versiones de PeAfpA quiméricas se inocularon 10^6 conidios/mL en 25 mL de medio mínimo de *Penicillium chrysogenum* (PcMM) (Sonderegger et al., 2016) y se evaluó la producción después de 3 y 5 días de crecimiento a 150 rpm y 25 ºC. Los análisis de producción de la proteína PeAfpA se efectuaron mediante inoculación de 10^6 conidios/mL en 250 mL de medio mínimo PcMM crecido hasta 10 días a 150 rpm y 25 ºC.

Los protocolos de clonación fueron realizados con la cepa *E. coli* JM109. Su crecimiento se efectuó en medio Luria Bertani (LB) suplementado con cloranfenicol (25 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) o espectinomicina (100 µg/mL) en función del vector. *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 (ATCC® BAA101™) fue crecida en medio sólido LB suplementado con rifampicina (20 µg/mL).

Construcción de los plásmidos para la transformación de *P. chrysogenum*

Para la generación de los vectores productores de las proteínas quiméricas se utilizó la plataforma de clonación FungalBraid (FB) (Hernanz-Koers et al., 2018). Las secuencias codificantes de PeAfpA y Sca fueron adaptadas a la gramática de GoldenBraid (https://gbcloning.upv.es) y sintetizadas por una empresa externa (IDT, Integrated DNA Technologies) como genes sintéticos (gBlocks). Cada uno de los elementos genéticos fue clonado en el vector de domesticación pUPD2. Las secuencias codificantes (FB254 a FB256 y FB294, ver Tabla 1) fueron ensambladas dos a dos (PeAfpA::PeAfpA, Sca::PeAfpA y PeAfpA::Sca) en el vector pDGB3α1R junto al promotor (FB107) y terminador (FB109) del gen *afpa* (Nivel 1 de ensamblaje). Las tres unidades transcripcionales (FB267, FB268 y FB277, ver Tabla 1) fueron combinadas con el casete de resistencia a geneticina (FB009) en el vector pDGB3Ω1 (Nivel 2) para obtener las construcciones multigénicas finales (FB285, FB286 y FB288, ver Tabla 1).

Tabla 1. Plásmidos generados para la producción de proteínas quiméricas

Plásmido	Construcción genética	Vector FB
FB254	Linker::PeAfpA [B4B5]	pUPD2
FB255	Linker::Sca [B4B5]	pUPD2
FB256	PeAfpA [B3]	pUPD2
FB294	Sca [B3]	pUPD2
FB267	FB107::FB256::FB254::FB109	pDGB3α1R
FB268	FB107::FB256::FB255::FB109	pDGB3α1R
FB277	FB107::FB294::FB254::FB109	pDGB3α1R
FB285	FB267 + FB009	pDGB3Ω1
FB286	FB268 + FB009	pDGB3Ω1
FB288	FB277 + FB009	pDGB3Ω1

Los clones positivos correspondientes a las reacciones de domesticación fueron confirmados mediante PCR colonia y secuenciación Sanger con los cebadores OJM524 (5'-GCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGG-3') y OJM525 (5'-CAGGGTGGTGACACCTTGCC-3'). La verificación de los clones tras las reacciones de Nivel 1 y 2 fue realizada mediante análisis de restricción y PCR colonia con los cebadores flanqueantes OJM533 (5'-CGAGTGGTGATTTTGTGCCG-3') y OJM534 (5'-CCCGCCAATATATCCTGTCAG-3').

Transformación genética de *P. chrysogenum*

La transformación genética de la cepa *P. chrysogenum* Δ*paf* con cada una de las construcciones multigénicas fue realizada mediante el método de transformación mediado por *A. tumafacines* (ATMT), tal y como se describe en Hernanz-Koers et al. (2018). Los transformantes monospóricos fueron seleccionados y aislados en medio PDA con 25 µg/mL de geneticina (G418) (Invivogen), verificando la integración ectópica de cada construcción mediante amplificación por PCR del ADN genómico con las parejas de cebadores OJM620 (5'-GCTTGTCCGGCCTTGTGACGCC-3')/OJM621

(5'- AGGAAGGCCCCGAGGAAGATGC-3') y OJM435 (5'-AACTGATATTGAAGGAGCAT-3')/OJM555 (5'-TCATCATGCAACATGCATGTA-3').

Purificación de la proteína recombinante PeAfpA y análisis por Western Blot

La purificación de la proteína PeAfpA se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio catiónico, tal y como queda descrito en Garrigues et al. (2018). Para la elución se aplicó un gradiente lineal de NaCl de 0M a 0,5M. La repurificación de PeAfpA y PAFB fue realizada mediante cromatografía de intercambio catiónico en buffer Tris HCl 20 mM pH 8 y gradiente lineal de NaCl de 0M a 0,3M. Las fracciones cromatógráficas fueron evaluadas mediante gel SDS-PAGE 16% y las fracciones de interés se mezclaron, se dializaron frente a H_2O Milli-Q y se liofilizaron. La concentración de las proteínas fue determinada a partir de su absorbancia (A_{280}) y coeficiente de extinción molar (PeAfpA ε_{280} = 0,639 y PAFB ε_{280} = 0,458).

Las proteínas totales de los sobrenadantes y las proteínas purificadas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 16%. El análisis por western blot se realizó mediante transferencia a membrana de nitrocelulosa Amersham Protran 0.20 µm NC (GE Healthcare) y revelado por quimioluminiscencia, tal y como se describe en Gandía et al. (2020). La detección fue realizada utilizando los anticuerpos de conejo anti-PeAfpA (1:2500), anti-PeAfpC (1:2500) (Garrigues et al., 2018) y anti-PAFB (1:1000) (Huber et al., 2018). La densitometría de las señales western blot se llevó a cabo con el software ImageJ (v 1.53a).

Identificación de proteínas mediante huella peptídica

El análisis proteómico de las fracciones purificadas fue realizado por la Unidad de Proteómica (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Las muestras fueron digeridas con tripsina, analizando los péptidos resultantes con el espectrómetro de masas 5800 MALDI TOF/TOF (ABSciex) e identificando las proteínas mediante comparación con la base de datos Uniprot-Penicillium200107 utilizando el software MASCOT (ABSciex)

Ensayos de protección *in vivo* en frutos de limón

Los ensayos de protección fueron realizados con frutos de limón (*Citrus limon* (L.) Burn) variedad 'Primafiori' adaptando el protocolo descrito en Gandía et al. (2021). En cada limón se realizaron un total de cuatro heridas distribuidas en el ecuador del fruto de manera equidistante (n = 48 - 60 heridas), aplicando un total de tres réplicas de cuatro-cinco limones por tratamiento (n = 12 - 15). Las heridas fueron inoculadas con 5 µL de agua estéril (control de herida), 5 µL de la suspensión de esporas (frutos infectados) o 5 µL de la suspensión de esporas preincubadas durante 24 h con PeAfpA a concentración 15 µM. Se evaluaron distintas concentraciones de inóculo inicial (10^4 - 5 x 10^3 conidios/mL para *P. digitatum* y 2,5 x 10^4 – 5 x 10^3 conidios/mL para *P. italicum*). Los frutos se mantuvieron a 20 ºC y 90% de humedad relativa, monitorizando la incidencia de la infección (porcentaje de heridas totales infectadas) a los 4, 5, 6 y 7 días post-infección (dpi). Los porcentajes obtenidos para cada dpi fueron sometidos a un análisis comparativo de las medias mediante test t de student con distribución bilaterial ($p < 0,05$) utilizando el software GraphPad Prism v. 6.01.

Resultados y Discusión

Generación de transformantes de *P. chrysogenum* para la bioproducción de proteínas quiméricas basadas en PeAfpA

Se diseñaron un total de tres proteínas quiméricas como aproximación para generar nuevas proteínas antifúngicas con propiedades mejoradas. Por un lado, se generó una versión dimérica de PeAfpA con la que evaluar el incremento potencial de su actividad antifúngica. Por otro lado, se generaron dos versiones quiméricas constituidas por la fusión de la proteína PeAfpA con Sca (*Secreted cysteine-rich anionic protein* y *scaffold*), proteína aniónica de pequeño tamaño secretada naturalmente por *P. digitatum* (Garrigues et al., 2020). La combinación de la secuencia codificante de Sca con el casete de

expresión *paf* ha permitido alcanzar elevados rendimientos de producción en *P. chrysogenum* (Garrigues *et al.*, 2020), lo que podría estar relacionado con una acción como "*scaffold*" o andamio molecular. Consecuentemente, la fusión de los dominios proteicos de PeAfpA con Sca tenía como objetivo evaluar el incremento potencial de los rendimientos de producción biotecnológica de PeAfpA. Además, en los tres diseños se incluyó una secuencia espaciadora que permitiese el plegamiento, seleccionando el péptido APKKVEP de la defensina MtDef5 (Islam et al., 2017).

La aplicación de la tecnología de ensamblaje FB permitió generar los vectores binarios finales (FB285, FB286 y FB288), codificantes de las proteínas AfpA::AfpA, AfpA::Sca y Sca::AfpA, respectivamente. Los transformantes monospóricos obtenidos como resultado de la transformación genética de *P. chrysogenum* fueron confirmados molecularmente, identificándose un total de 13, 11 y 16 transformantes positivos para la construcción FB285 (PeAfpA::PeAfpA), FB286 (PeAfpA::Sca) y FB288 (Sca::PeAfpA), respectivamente. Finalmente, se evaluó la capacidad de producción y secreción de las proteínas quiméricas de los transformantes tras 3 y 5 días de crecimiento. La Figura 1 ejemplifica la evaluación de once de los transformantes confirmados molecularmente. Como resultado, ninguna de las cepas transformantes fue capaz de producir banda proteica del peso molecular estimado, de 14 kDa para el dímero de PeAfpA y de 19,7 kDa para su combinación con Sca (Figura 1, panel superior). La incapacidad de producir las proteínas quiméricas bajo las condiciones evaluadas en este trabajo fue confirmada mediante inmunodetección con el anticuerpo policlonal anti-PeAfpA (Figura 1, panel inferior). Las proteínas tampoco fueron detectadas en los sobrenadantes tras 3 días de cultivo, por lo que su ausencia a día 5 no parece corresponderse con fenómenos de degradación proteica.

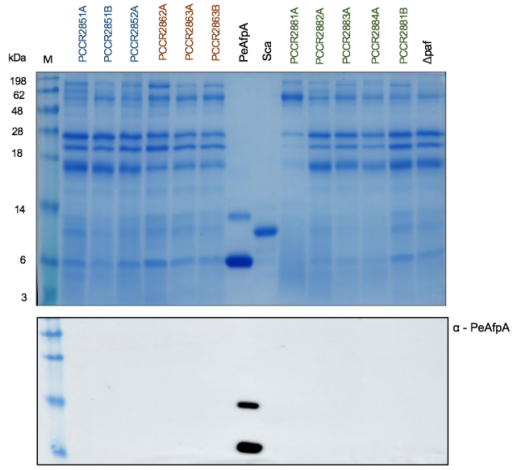


Figura 1. Análisis de los sobrenadantes de cultivo de once las cepas transformantes totales evaluadas mediante SDS-PAGE. Tinción azul coomasie de once de los sobrenadantes 10X evaluados tras 5 días de crecimiento (panel superior) y western blot para la detección de PeAfpA (panel inferior). Se cargaron 2 µg de PeAfpA y Sca puras como controles. M: SeeBlue Pre-stained protein standard.

Es asimismo resaltable la baja eficiencia de transformación alcanzada mediante el método ATMT (datos no incluidos). Tanto la incapacidad de detectar las proteínas quiméricas como la baja eficiencia de transformación podrían estar relacionados con un efecto tóxico asociado a la actividad antifúngica de las proteínas, favoreciendo la selección de los transformantes en donde se han producido eventos de inserción aberrantes y/o mutaciones que impiden su correcta expresión. Por otro lado, la estrategia seguida en este trabajo se basó en reproducir el espaciador identificado entre los dos dominios de la defensina MtDef5. Sin embargo, los resultados obtenidos resaltan la importancia de utilizar nuevas secuencias espaciadoras en base al modelado de la estructura terciaria esperable para cada proteína.

Optimización de las condiciones de producción y purificación de PeAfpA en *P. chrysogenum*

La futura aplicación agroalimentaria de las proteínas antifúngicas requiere de sistemas de producción eficientes y seguros. Trabajos previos realizados por el grupo de investigación han permitido generar

una cepa sobreproductora (PcMG0052) de la proteína antifúngica PeAfpA mediante el casete de expresión *afpa*, basado en el promotor y el terminador del gen *afpA*, adaptado a la tecnología FB. Con el objetivo de optimizar las condiciones de producción de PeAfpA en el sobreproductor PcMG0052, se evaluó su capacidad de secreción de la proteína a distintos tiempos de cultivo en comparación con la cepa silvestre CMP-1 de *P. expansum* (Figura 2).

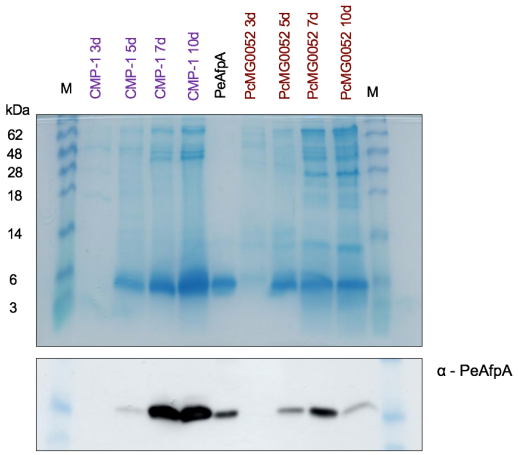


Figura 2. Análisis por western blot de los sobrenadantes de *P. expansum* CMP-1 y de la cepa sobreproductora *P. chrysogenum* PcMG0052 a lo largo del tiempo. Gel SDS-PAGE 16% de los sobrenadantes 5X tras 3, 5, 7 y 10 días de crecimiento en PcMM (panel superior) y western blot para la detección de PeAfpA (panel inferior). Se cargó 1 µg de proteína pura PeAfpA como control. M: SeeBlue Pre-stained protein standard.

Para la cepa CMP-1 de *P. expansum*, productor natural de PeAfpA, se detectó una banda proteica del peso molecular esperado (~6 kDa) desde el día 5, alcanzando una intensidad creciente hasta el día 10. En el transformante *P. chrysogenum* PcMG0052, en cambio, esta banda proteica presentó una intensidad aparentemente similar desde el día 5. La detección inmunoquímica de PeAfpA confirmó una producción superior de la proteína a tiempos largos (7 y 10 días) en la cepa CMP-1, mientras que en PcMG0052 la mayor producción se alcanzó en el día 7. Además, la comparación densitométrica a tiempos cortos (3 y 5 días) resaltó la ausencia de PeAfpA a día 3 y su secreción en cantidades ligeramente superiores en *P. chrysogenum* a día 5. Por tanto, se procedió a comparar el rendimiento de purificación de PeAfpA a partir de los sobrenadantes de cultivo de cada cepa tras 5 días de crecimiento.

En concordancia con las propiedades fisicoquímicas de PeAfpA (pI = 9,48), la proteína madura secretada por *P. expansum* fue purificada con éxito mediante cromatografía de intercambio catiónico a pH 6,5, identificando un único pico de elución. En cambio, durante la purificación de PeAfpA secretada por PcMG0052 se identificaron dos picos de elución independientes, correspondientes a las fracciones 4-7 y 14-15 (Figura 3A). La evaluación de estas fracciones cromatográficas mediante SDS-PAGE mostró la coelución de dos bandas de distinto peso molecular (~38 y 6 kDa) en la fracción 5 y la presencia de dos bandas de peso molecular similar (~6 kDa) en las fracciones 14-15 (Figura 3B). El análisis de huella peptídica permitió identificar las proteínas eluidas conjuntamente en la fracción 5, correspondientes con una arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidasa de *P. chrysogenum* (hit score 505; E-value 1,1e-45) de 36 kDa y con la proteína antifúngica PAFC de *P. chrysogenum* (hit score 184; E-value 1,4e -13) de 6,6 kDa en su forma madura (Holzknecht et al., 2020). Las bandas de las fracciones 14 correspondían con la proteína antifúngica PAFB de *P. chrysogenum* (hit score 143; E-value 1,7 e-09) de 6,5 kDa (Huber et al., 2018) y con la proteína madura PeAfpA de *P. expansum* (hit score 144; E-value 1,1e -12) de 6,6 kDa. Tal y como era esperable, el orden de elución identificado en el cromatograma es concordante con el punto isoeléctrico teórico de cada una de estas proteínas. En contraposición, la migración electroforética observada para las proteínas antifúngicas PAFB, PAFC y PeAfpA difería levemente del patrón de migración esperable en base a su peso molecular, lo que está relacionado con su elevada carga positiva como proteínas catiónicas de pequeño tamaño.

El análisis por huella peptídica permitió verificar además el correcto procesamiento post-traduccional de la proteína PeAfpA en *P. chrysogenum*, sin identificarse cambios con respecto a la proteína madura procesada naturalmente en *P. expansum* (Figura 3C).

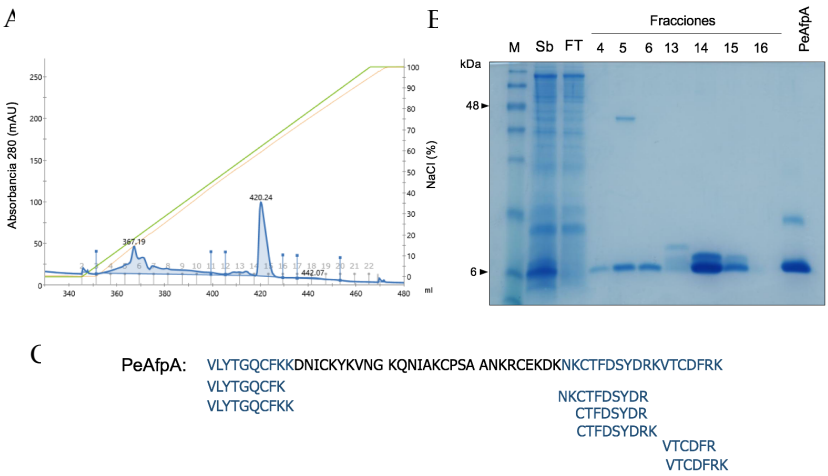


Figura 3. Purificación e identificación de PeAfpA secretada por el sobreproductor PcMG0052. (A) Cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de PeAfpA, se muestra la absorbancia a 280 nm (azul) y el gradiente de NaCl (línea verde) (B) Gel SDS-PAGE 16% de las fracciones cromatográficas. Sb: sobrenadante crudo; FT: flow-through; M: SeeBlue Pre-stained protein standard. Se cargó 1 µg de proteína pura PeAfpA como control. (C) Identificación por huella peptídica de PeAfpA.

La producción homóloga y heteróloga de AFPs en la cepa parental mutante Δ*paf* tiene como objetivo evitar la co-expresión de la proteína antifúngica PAF, producida de forma natural en cantidades muy elevadas (Sonderegger et al., 2016). Sorprendentemente, en este trabajo se identificó la secreción simultánea de las proteínas nativas PAFB y PAFC de *P. chrysogenum*, junto con la proteína heteróloga PeAfpA, a día 5 de incubación. Hasta el momento únicamente se había detectado la presencia de PAFC en los sobrenadantes de cultivo de la cepa parental Q176 de *P. chrysogenum* tras 96 h de crecimiento en medio mínimo (Holzknecht et al., 2020). Por su parte, la producción natural de PAFB sólo había sido descrita bajo condiciones de exceso de nutrientes (Huber et al., 2019). Por tanto, este trabajo es el primero en describir la producción natural de PAFB y PAFC en la cepa Δ*paf* de *P. chrysogenum*.

La producción simultánea de hasta tres proteínas antifúngicas en los sobrenadantes del sobreproductor PcMG0052 permite considerar estrategias futuras basadas en la utilización de "*cocktails*" proteicos como agentes de control postcosecha. En este contexto, ensayos *in vitro* de actividad antifúngica han mostrado la existencia de interacciones sinérgicas que mejoran la capacidad antimicrobiana de distintas AFPs (Gandía et al., 2020). En contraposición, Gandía et al. (2021) no fueron capaces de detectar efecto sinérgico o aditivo al evaluar la combinación de PeAfpA y PAFB en el control de *P. digitatum* y *P. expansum* en frutos de naranja y manzana, respectivamente. En este sentido, la caracterización del modo de acción de la proteína PeAfpA y la determinación de los mecanismos de interacción entre distintas AFPs jugará un papel clave.

Dado que PeAfpA y PAFB presentaban un mismo patrón de elución, se evaluó la capacidad de separar ambas proteínas en base a su punto isoeléctrico teórico, de 9,48 y 8,83, respectivamente. Como resultado, la purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico en tampón Tris HCl pH 8 y gradiente de elución en NaCl 0-0,3M permitió separar ambas proteínas en dos picos cromatográficos independientes, correspondientes a la proteína PAFB y PeAfpA, respectivamente (Figura 4).

El rendimiento total obtenido de PeAfpA y PAFB puras tras las dos cromatografías fue de 4,8 y 5,3 mg/L, respectivamente. Por su parte, el rendimiento de purificación de PeAfpA a partir del cultivo de CMP-1 fue 4,2 mg/L, similar al obtenido con la cepa sobreproductora PcMG0052. Sin embargo, este

rendimiento es altamente inferior al descrito con CMP-1 tras 10 días de incubación (125 mg/L) (Garrigues et al., 2018). A pesar de ello, es esperable que la ejecución de una única cromatografía bajo las condiciones optimizadas en este trabajo permita minimizar las pérdidas asociadas al proceso de purificación. Asimismo, hay que destacar que *P. expansum*, productor natural de PeAfpA, es un hongo fitopatógeno y micotoxigénico, mientras que *P. chrysogenum* ha sido utilizado en la producción de metabolitos secundarios de interés económico (Guzmán-Chávez et al., 2018).

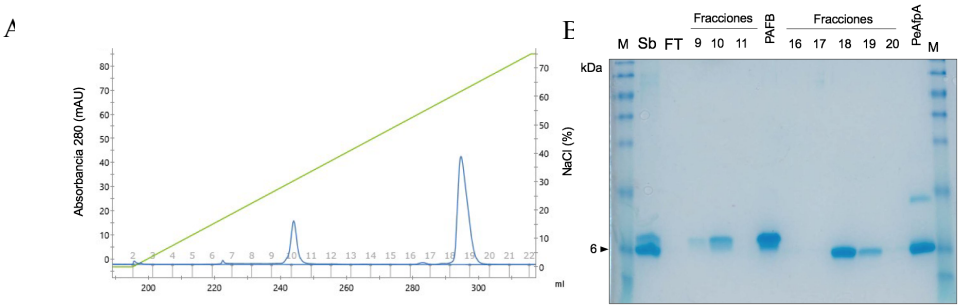


Figura 4. Repurificación de PeAfpA y PAFB. (A) Cromatograma de la purificación en columna de intercambio catiónico a pH 8, en donde se muestra la absorbancia a 280 nm (azul) y el gradiente de NaCl (línea verde). (B) Gel SDS-PAGE 16% de las fracciones correspondientes a los picos cromatográficos. Sb: sobrenadante crudo; FT: flow-through; M: SeeBlue Pre-stained protein standard. Se cargaron 2 µg de proteína pura de PeAfpA y PAFB como controles de la migración.

Efecto protector de PeAfpA frente a *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* en limones

La proteína PeAfpA ha demostrado presentar un efecto protector frente a la podredumbre verde causada por *P. digitatum* en naranjas cv. Navel (Garrigues et al., 2018). Basándonos en estos resultados, se evaluaron las condiciones de inoculación requeridas para determinar el efecto de PeAfpA frente a *P. digitatum* y *P. italicum* sobre frutos de limón (*Citrus limon (L.) Burn*) variedad 'Primafiori'.

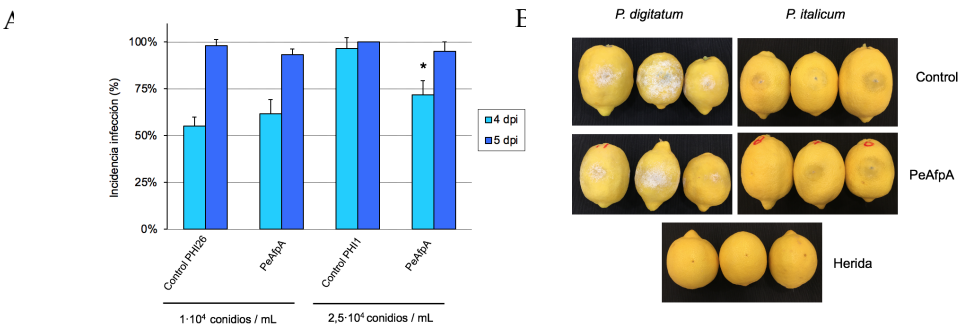


Figura 5. Efecto de PeAfpA sobre la infección de limones con *P. digitatum* (PHI26) y *P. italicum* (PHI1). (A) Efecto de PeAfpA (15 µM) sobre la infección de limones variedad 'Primafiori'. Las barras representan la media ± desviación típica para tres réplicas de cinco limones a día 4 y 5 post-infección (dpi). El asterisco indica la existencia de diferencias significativas comparado con el control para cada dpi (test t-student, *p<0,05). (B) Imagen representativa de los tratamientos a 4 dpi.

Se realizó un primer ensayo con el que determinar el efecto protector asociado a la aplicación de 100 µg/mL de PeAfpA (15 µM) frente al crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum* a una concentración de 1 x 10^4 y 2,5 x 10^4 conidios/mL, respectivamente (Figura 5). En este caso, PeAfpA no provocó una reducción de la incidencia de la infección de *P. digitatum* tras 4 y 5 dpi. En cambio, el tratamiento con PeAfpA sí mostró una disminución significativa del porcentaje de heridas infectadas por *P. italicum* a 4 dpi, con una reducción media del 25% respecto a los limones no tratados con PeAfpA. Sin embargo, esta protección se perdía a 5 dpi. Además, las dosis de inóculos aplicadas generaron una infección

prácticamente completa (100%) en los limones control a 5 dpi, lo que resalta la agresividad de las condiciones testadas. En contraposición, la realización de un segundo ensayo en el que se redujo la dosis de inóculo inicial de *P. italicum* hasta 1 x 10^4 y 5 x 10^3 conidios/mL permitió evaluar la progresión de la infección a 4, 5 y 6 dpi. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el primer ensayo, no se detectaron diferencias significativas asociado a la aplicación de PeAfpA (datos no mostrados). Estos resultados son coincidentes con los observados sobre naranjas var. Lanelate y Navel (Gandía et al., 2021). Además, resaltan la existencia de discrepancias entre los ensayos de protección *in vivo* y los ensayos *in vitro* (Garrigues et al., 2018). Estas diferencias podrían ser causa de diversos factores, como la presencia de sustratos de los cítricos que reduzcan la susceptibilidad de los hongos a las AFPs.

Tal y como se observa en la Figura 6, el tratamiento con 15 µM de PeAfpA y la inoculación con una concentración de 5 x 10^3 conidios/mL de *P. digitatum* permitió identificar una reducción significativa de la incidencia de la infección desde el día 4 post-infección. A día 7, la incidencia media fue del 65% en los limones tratados con PeAfpA, un 27% inferior al grupo control. Este efecto protector frente a *P. digitatum* fue únicamente observable cuando se aplicó una concentración de inóculo inicial lo suficientemente baja como para permitir monitorizar la evolución de la infección, lo que resalta la importancia de optimizar las condiciones de inoculación aplicadas. Además, es necesario considerar el hecho de que la inoculación aislada de PeAfpA en cada una de las heridas podría estar contribuyendo al crecimiento preferencial del micelio una vez alcanza las áreas colindantes a las heridas. Por tanto, la confirmación de la viabilidad de PeAfpA como agente post-cosecha en frutos de limón requerirá de la ejecución de ensayos que reflejen las condiciones de aplicación comerciales.

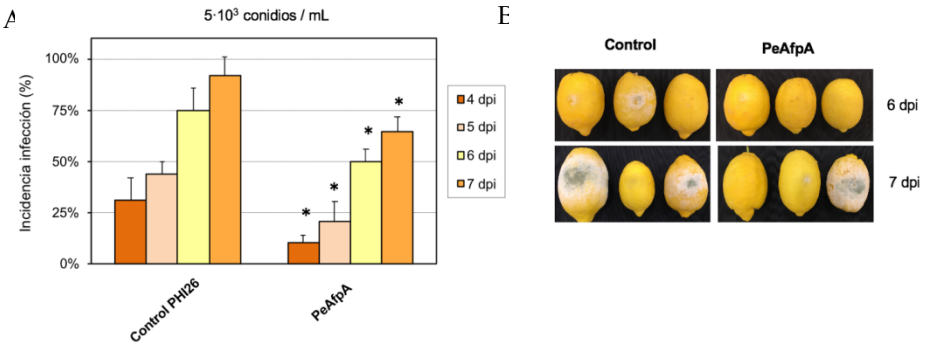


Figura 6. Efecto de PeAfpA sobre la infección de limones con *P. digitatum* (PHI26). (A) Efecto de PeAfpA (15 µM) sobre la infección de limones variedad 'Primafiori' inoculados con *P. digitatum*. Las barras representan la media media ± desviación típica para tres réplicas de cuatro limones a día 4, 5, 6 y 7 post-infección (dpi). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas comparado con el control para cada dpi (test t-student, *$p < 0,05$). (B) Imágenes representativas de la infección en limones control (infección) y tratados.

Conclusiones

El objetivo global de este trabajo ha sido evaluar distintas estrategias biotecnológicas con las que optimizar la producción de la proteína antifúngica PeAfpA en *P. chrysogenum*. El análisis del transformante PcMG0052 de *P. chrysogenum* ha permitido verificar la capacidad de secreción y procesado de la proteína PeAfpA mediante su expresión heteróloga bajo el control de su propio promotor *afpa*, validando la potencialidad de *P. chrysogenum* como factoría biológica de esta AFP. Asimismo, se ha detectado por primera vez la producción simultánea de las proteínas antifúngicas PAFB y PAFC de *P. chrysogenum*, habiendo optimizado exitosamente las condiciones requeridas para la purificación de PeAfpA. Finalmente, la determinación del efecto protector de PeAfpA frente a *P. digitatum* y *P. italicum* en frutos de limón variedad 'Primariofi' ha permitido identificar un efecto protector leve frente a *P. digitatum*, que deberá ser confirmado en trabajos posteriores.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido ejecutado como parte del proyecto RTI2018-099664-B-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. La autora C.R. ha realizado este trabajo como becaria JAE-intro 2020.

Bibliografía

Delgado, J., Owens, R.A., Doyle, S., Asensio, M.A., and Núñez, F. (2016). Antifungal proteins from moulds: analytical tools and potential application to dry-ripened foods. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 6991–7000.

Gandía, M., Monge, A., Garrigues, S., Orozco, H., Giner-Llorca, M., Marcos, J.F., and Manzanares, P. (2020). Novel insights in the production, activity and protective effect of *Penicillium expansum* antifungal proteins. Int. J. Biol. Macromol. 164, 3922–3931. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.208

Gandía, M., Kakar, A., Giner-llorca, M., Holzknecht, J., and Mart, P. (2021). Potential of Antifungal Proteins (AFPs) to Control *Penicillium* Postharvest Fruit Decay. 7(6), 449. https://doi.org/10.3390/jof7060449

Garrigues, S., Gandía, M., Castillo, L., Coca, M., Marx, F., Marcos, J.F., and Manzanares, P. (2018). Three antifungal proteins from *Penicillium expansum*: Different patterns of production and antifungal activity. Front. Microbiol. 9, 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02370

Garrigues, S., Marcos, J.F., Manzanares, P., and Gandía, M. (2020). A novel secreted cysteine rich anionic (Sca) protein from the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum* enhances virulence and modulates the activity of the Antifungal Protein B (AfpB). J. Fungi 6, 1–17. https://doi.org/10.3390/jof6040203

Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R.D., Bovenberg, R.A.L., and Driessen, A.J.M. (2018). Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. Front. Microbiol. 9, 2768.

Hegedüs, N., and Marx, F. (2013). Antifungal proteins: More than antimicrobials? Fungal Biol. Rev. 26, 132–145. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.002

Hernanz-Koers, M., Gandía, M., Garrigues, S., Manzanares, P., Yenush, L., Orzaez, D., and Marcos, J.F. (2018). FungalBraid: A GoldenBraid-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology. Fungal Genet. Biol. 116, 51–61. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.04.010

Holzknecht, J., Kühbacher, A., Papp, C., Farkas, A., Váradi, G., Marcos, J.F., Manzanares, P., Tóth, G.K., Galgóczy, L., and Marx, F. (2020). The *Penicillium chrysogenum* Q176 antimicrobial protein pafc effectively inhibits the growth of the opportunistic human pathogen Candida albicans. J. Fungi 6, 1–21. https://doi.org/10.3390/jof6030141

Huber, A., Hajdu, D., Bratschun-Khan, D., Gáspári, Z., Varbanov, M., Philippot, S., Fizil, Á., Czajlik, A., Kele, Z., Sonderegger, C., et al. (2018). New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: A Cationic, cysteine-rich protein from *Penicillium chrysogenum* Q176. Sci. Rep. 8, 1–16. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20002-2

Huber, A., Lerchster, H., and Marx, F. (2019). Nutrient excess triggers the expression of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAFB. Microorganisms 7, 15–18. https://doi.org/10.3390/microorganisms7120654

Islam, K.T., Velivelli, S.L.S., Berg, R.H., Oakley, B., and Shah, D.M. (2017). A novel bi-domain plant defensin MtDef5 with potent broad-spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers. Sci. Rep. 7, 16157. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16508-w

Palou, L. (2014). Chapter 2 - Penicillium digitatum, Penicillium italicum (Green Mold, Blue Mold). S.B.T.-P.D. Bautista-Baños, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 45–102. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8

Sánchez-Torres, P., and Tuset, J.J. (2011). Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 159–165. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.08.017

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Aplicación de GABA y 1-MCP: efecto sobre el almacenamiento refrigerado de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

E. Bernabé-García, M.C. Ruiz-Aracil, F. Guillén, J.M. Valverde

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental CIAGRO. Grupo de Investigación en Post-recolección de Frutas y Hortalizas. Universidad Miguel Hernández, carretera de Beniel km 3.2 Orihuela, Alicante, e-mail: ester.bernabe@goumh.umh.es

Resumen

El cultivo del tomate es uno de los más importantes a nivel nacional, de hecho, España es uno de los principales países exportadores. Los tomates son frutos con una vida útil muy corta, y pese a que la refrigeración suele ser una buena herramienta para alargar la vida útil del tomate puede provocar daños que impide su comercialización o consumo. En este estudio hemos evaluado el efecto de distintos tratamientos postcosecha con demostrada efectividad en la reducción de estas fisiopatías, ya que son capaces de incrementar la tolerancia de los tomates a las bajas temperaturas. Para ello se ha comparado un compuesto comercial de origen artificial (1-MCP) con un aminoácido no proteico derivado del ácido glutámico (GABA) en los diferentes órganos de las plantas. Los elicitores en los tejidos vegetales inducen cambios fisiológicos a partir de los cuales se activan mecanismos similares a las respuestas de defensa afectando así al metabolismo de la planta. Tras aplicar los tratamientos y una vez evaluados los frutos se observó que mantuvieron la calidad general de los tomates y retrasaron la degradación de los compuestos bioactivos. Así, los elicitores naturales aplicados afectaron al contenido endógeno de compuestos bioactivos presentes en los tomates en comparación con los frutos controles o los tratados con sustancias de origen artificial. Por tanto, la utilización de compuestos de origen natural podría sustituir o permitir la reducción de compuestos de origen artificial ampliamente utilizados en la comercialización de estos frutos.

Palabras clave: Conservación, GABA, 1-MCP, carotenos, clorofilas

Substances of natural origin versus compounds of artificial origin: effect on the refrigerated storage of tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

Abstract

Tomato cultivation is one of the most important at national level, moreover, Spain is one of the major exporters countries. Tomatoes have a short shelf life, refrigeration is used to expand its shelf-life but it can cause chilling injures and prevent it commercialization and intake In this study we have evaluated the effects of different postharvest treatments that have demonstrated effectivity on decrease this physiopathies, because it can increase tomato tolerance to low temperatures. In order to achieve that, an artificial commercial compound (1-MCP) has been compared to an elicitor present in some plant organs (GABA). Vegetal tissues elicitors promote physiological changes which activate defense response like mechanism and affects to plan metabolism. Once the treatments were applied and the fruits were evaluated, general high-quality values were observed and a delay in bioactive compounds degradation. This way, natural applicated elicitors were able to affect in endogenous bioactive compound present in tomato in comparation to the control fruits or the artificial origin substance treatment. For that, the use of natural compounds could substitute or lend the artificial compound reduction mainly used on fruit commercialization.

Keywords: Conservation, GABA, 1-MCP, carotenoid, chlorophyll

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia de las solanáceas y, como tal, es un fruto climatérico. Por lo tanto, el etileno desempeña un papel esencial en la maduración normal y completa del tomate durante la etapa postcosecha (Shinozaki et al., 2018; Li et al., 2019). El etileno inicia una cascada de cambios bioquímicos que desencadena el cambio de un tomate verde, duro y sin sabor en una fruta atractiva, con un color brillante, suculenta y nutritiva (Li et al., 2019). Las acciones desencadenadas por el etileno se pueden regular en distintos niveles desde la biosíntesis del etileno hasta en los receptores de este (Karlova et al., 2014; Mata et al., 2018; Li et al., 2019).

El tomate es el segundo cultivo mayoritario de frutas y hortalizas tras la patata (*Solanum tuberosum* L.). Es un ingrediente esencial dentro de la alimentación a nivel mundial, destacando principalmente en la dieta mediterránea, donde se consume tanto crudo como incluido en una gran variedad de recetas. Al ser un producto que se ofrece para consumo fresco, hay dos aspectos clave en su calidad: apariencia (color y firmeza) y sabor (sólidos solubles totales y acidez). Además, el tomate está asociado con efectos beneficiosos para la salud, por lo que estas sustancias bioactivas (compuesto fenólicos y carotenoides) también se consideran un indicador de calidad en el tomate (Kim et al., 2016; Livingstone et al., 2019; Fraser et al., 2020). Al ser un producto tan ampliamente consumido, también existe una alta comercialización y, es por esto, que es necesario aplicar tecnologías postcosecha para prolongar su calidad y vida útil. La tecnología aplicada universalmente es el almacenamiento en frío, que es capaz de detener el proceso natural de maduración al reducir el metabolismo vegetal, haciendo que el fruto alcance una menor tasa de respiración y producción de etileno, aumentando así su vida útil (Park et al., 2021; Zhou et al., 2021). Sin embargo, el almacenamiento en frío prolongado provoca daños por frío, produciendo un desorden fisiológico acumulativo que se caracteriza por pérdida de sabor, olor, firmeza, ablandamiento y defectos visuales. Además, los daños por frío pueden hacer que los frutos sean más susceptibles al ataque de diferentes especies microbianas produciendo podredumbres (Park et al., 2021; Zhou et al., 2021).

Todo esto puede afectar a la síntesis de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los componentes bioactivos. Los metabolitos secundarios se empiezan a sintetizar una vez que el fruto ha crecido y su síntesis se prolonga durante la etapa de maduración, generalmente después del estado "breaker" de la maduración. Entre estos metabolitos secundarios encontramos compuestos orgánicos volátiles (derivados de ácidos orgánicos, de aminoácidos, de carotenoides, etc.), carotenoides y alcaloides (Thoge et al., 2013).

Con el fin de prolongar la vida útil de los productos vegetales, así como su calidad, se emplean distintos tratamientos postcosecha. Entre estos tratamientos se encuentran: envasado en atmósfera protectora (Fagundes et al., 2015), aplicación de metil jasmonato (Min et al., 2020), recubrimientos comestibles (Peralta-Ruiz et al., 2020; Safari et al., 2020), liposomas de nitroxilo (Liu et al., 2021), e incluso tratamientos biológicos como el uso de *Bacillus subtilis* L1-21 o *Streptomyces* sp (Evangelista-Martínez et al., 2020; Bu et al., 2021).

Por otro lado, y de forma generalizada, actualmente las aplicaciones comerciales con 1-metilciclopropeno o 1-MCP han adquirido gran relevancia. El 1-MCP es una sustancia de origen artificial que actúa como un potente inhibidor de la acción del etileno, manteniendo de forma muy significativa la calidad general tras la recolección tanto del tomate como de otros muchos productos vegetales. Está clasificado como regulador del crecimiento con un modo de acción inocuo para el ser humano (Gaikwad et al., 2020). Es capaz de detener o retrasar la maduración en productos hortofrutícolas, mientras que en algunos vegetales y frutos no climatéricos es capaz de detener la senescencia. Sin embargo, el efecto que produce está vinculado a la variedad sobre la que se aplica, el estado de maduración previo al tratamiento y la dosis aplicada (Zhao et al., 2020; Huan et al., 2020).

El ácido γ-aminobutírico o GABA es un ácido no proteico de cuatro carbonos que se encuentra en animales, plantas y bacterias. En animales es un importante neurotransmisor inhibidor y tiene algunos efectos positivos para la salud (Shimada et al., 2009). La importancia funcional del GABA en las plantas, sin embargo, todavía no se entiende bien. Se relaciona con una gran variedad de procesos y

ciclos metabólicos, como el ciclo del nitrógeno y carbono o el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Obata y Fernie, 2012; Hijaz y Killiny, 2020).

El GABA ha demostrado tener efectos positivos cuando se aplica como tratamiento postcosecha en tomate, se ha visto que es capaz de otorgar protección frente a los daños por frío, reducir la pérdida de firmeza y mantener los parámetros relacionados con la calidad en el tomate durante su almacenamiento en frío (Aghdam et al., 2019; Gaikwad et al., 2020; Habibi et al., 2019). En este estudio ponemos de manifiesto el impacto que tienen compuestos de origen natural como el GABA frente a compuestos de origen artificial ampliamente usados como es el 1-MCP.

Material y Métodos

El material vegetal, utilizado para la realización de este estudio fue tomate tipo RAF cv "Conquista" recolectados en una finca comercial de Almería. Se seleccionaron 255 frutos homogéneos. En este estudio se han aplicado 3 tratamientos diferentes de 60 frutos cada uno. GABA 10 mM y 1-MCP a la dosis de 500 ppb, y finalmente un lote control en agua destilada. Además, se agruparon en lotes de quince tomates divididos en tres muestras de 5 tomates cada uno. Además, se seleccionaron otros quince frutos para evaluar el día 0 para establecer así las condiciones en que los tomates llegaron al laboratorio.

Los tratamientos fueron aplicados por inmersión por un tiempo de diez minutos, se dejaron secar y se almacenaron a 4°C durante 28 días para ser evaluados semanalmente. Tras la salida del almacenamiento en frío, los frutos se almacenaron a 20ºC durante 7 días para evaluar su vida útil. La dosis de 1-MCP fue escogida de entre las seleccionadas anteriormente en esta especie vegetal por Guillén et al., (2007). Los tratamientos con 1-MCP se realizaron mediante la mezcla de pastillas comerciales liberadoras de este compuesto a las dosis aplicadas, con una solución activadora comercial, todo proporcionado por SmartFresh (AgroFresh Inc., Philadelphia, PA) en contenedores herméticos de 130 L. En primer lugar, se realizaron las medidas no destructivas. La respiración y el etileno se determinaron mediante sistema estático de forma individual en 15 tomates de cada tratamiento (n=6); el peso y el color, se determinó individualmente en cada tomate (n=15). La evaluación del color se determinó utilizando el sistema CIELAB (L*, a*, b*) por medio de un colorímetro triestímulo Minolta modelo CR400, realizándose tres medidas del color para cada fruto en 3 puntos equidistantes longitudinalmente (n=30). Los parámetros destructivos como la actividad antioxidante y el contenido en polifenoles totales se evaluaron en muestras homogéneas de cada lote (n=6). Todas estas evaluaciones han sido realizadas siguiendo las indicaciones descritas por Serrano et al., (2009). La determinación de flavonoides (n=6) se realizó sobre la muestra homogénea descrita anteriormente siguiendo el método descrito por Lezoul et al., (2020). El contenido en carotenos se evaluó mediante extracción en metanol aplicando tanto el método como las ecuaciones descritas por Bruinsma, (1963).

Los daños por frío se evaluaron de forma visual siguiendo las indicaciones descritas por Ding et al., (2002). De esta forma se asignó una escala de 0-4 donde 0= sin daños, 1= menos de un 5% de la superficie afectada, 2= 5-15% superficie, 3=16-25% superficie y 4=más de un 25% de la superficie.

Este experimento tiene un diseño completamente aleatorio. Las diferencias entre los distintos tratamientos se han estudiado mediante análisis de la varianza. Cuando las diferencias mostradas por las distintas muestras han resultado ser significativas ($p < 0.05$), las medias se han separado mediante el Test Tukey. Todos los análisis se han realizado con el Software SPSS v. 20.0.

Resultados y Discusión

Tras estudiar las pérdidas de peso pudimos comprobar como estas fueron incrementando a lo largo de los días independientemente del tratamiento (figura 1A). Los tratamientos con GABA obtuvieron valores significativamente mayores ($P < 0.05$) en varios de los muestreos. Por otro lado, en la figura 1B observamos cómo evoluciona la tasa de respiración de los frutos, observándose un aumento general a partir de la segunda semana de almacenamiento refrigerado más un periodo adicional de 7

días a 20ºC. Sin embargo, únicamente los tratamientos que contenían 1-MCP consiguieron reducir la respiración siendo el valor más bajo al final del experimento.

La pérdida de peso tras la recolección se debe a la pérdida de agua por los procesos de transpiración del fruto. En estudios previos, se ha comprobado que el GABA participa en los procesos osmóticos tras la recolección, por lo que reduce los fenómenos de transpiración y la pérdida de peso (Palma et al., 2019). También se ha comprobado que el 1-MCP es capaz de disminuir las pérdidas de peso en los frutos al ralentizar los procesos de maduración (Habibi et al., 2020). Por otro lado, se ha visto que GABA es capaz de mejorar la tasa de respiración de los frutos y así reducir el estrés que sufren (Hijaz et al., 2018).

En la figura 2A observamos como el etileno se comporta de una forma similar a la tasa de respiración, se observa un incremento en la producción de etileno en el tercer muestreo. De nuevo, el tratamiento con 1-MCP es el que obtuvo la menor producción de etileno reduciendo estos niveles. Respecto al color, en este estudio se muestran la evolución del ángulo Hue* (figura 2B). Los tomates tratados con MCP mantuvieron un retraso en la evolución del color de forma significativa ($P < 0.05$), mientras que en el grupo control y el tratamiento con GABA el viraje de color se produjo tras los primeros 7 días de almacenamiento a 20ºC.

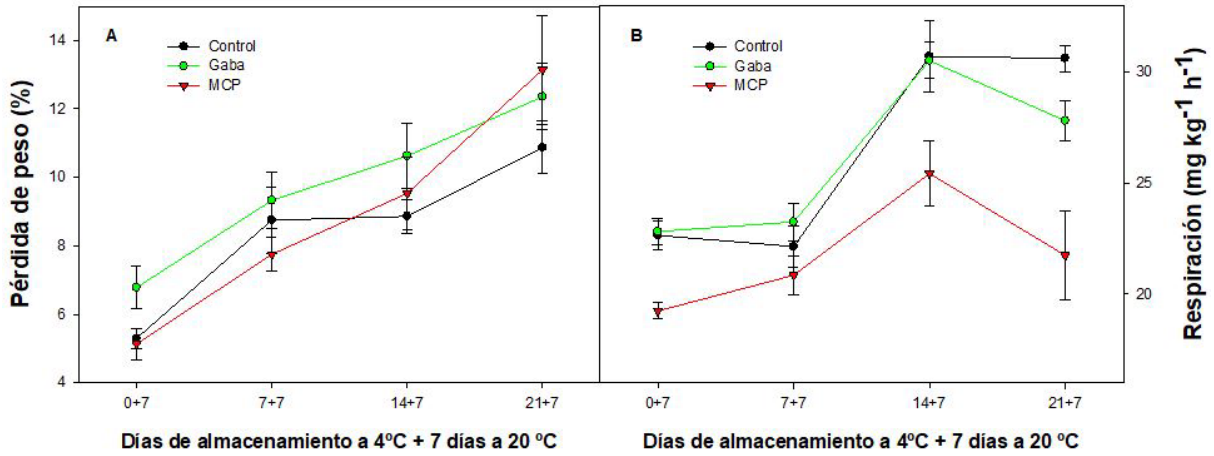


Figura 1. (A) Evolución de las pérdidas de peso (%) y (B) de la respiración (mg $kg^{-1}h^{-1}$), en los tomates control y los tratados con GABA y 1-MCP durante el almacenamiento a 4ºC ± 7 días a 20ºC. Los valores medios ± ES seguidos de distintas letras son estadísticamente diferentes para p<0,05 en cada día de muestreo.

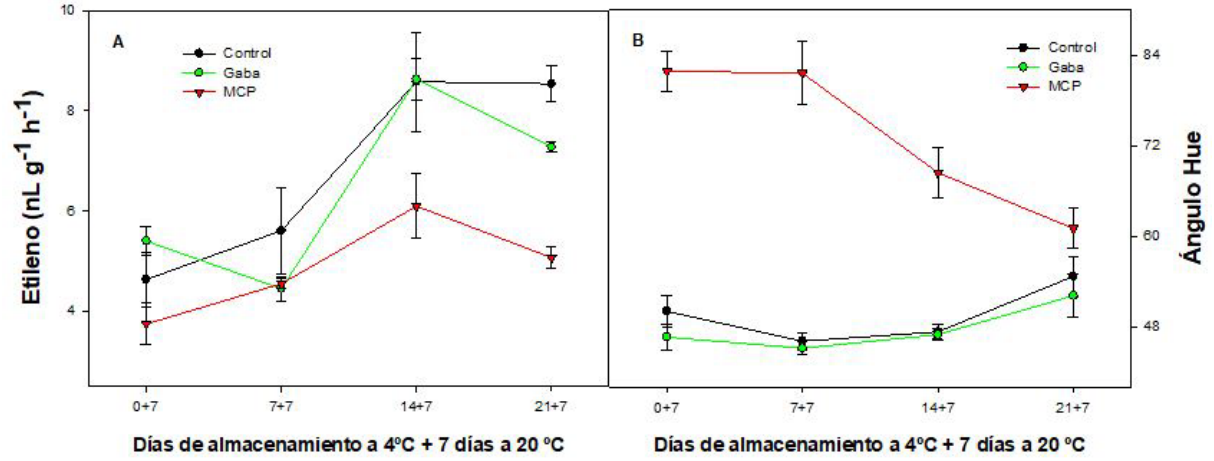


Figura 2. (A) Evolución de la producción de etileno (nL g^{-1} h^{-1}) y (B) del ángulo HUE, en los tomates control y los tratados con GABA y 1-MCP, durante el almacenamiento a 4ºC ± 7 días a 20ºC. Los valores medios ± ES seguidos de distintas letras son estadísticamente diferentes para p<0,05 en cada día de muestreo.

En consonancia con lo observado en este experimento, en estudios previos se ha observado que el GABA disminuye la actividad metabólica de las células, reduciendo así la producción de etileno (Han et al., 2018). El 1-MCP es un inhibidor competitivo de los receptores de etileno, por lo que, al aplicarlo, la producción de etileno se ve disminuida (Xu et al., 2019).

En estudios previos se ha comprobado que el uso de GABA durante el almacenamiento a 15ºC no tuvo efectos significativos en el cambio de tonalidad (Rastegar et al., 2020). Sin embargo, el 1-MCP ha demostrado tener efecto sobre el cambio de color asociado con la maduración, retrasando dicho cambio en la tonalidad (Gaikwad et al., 2020).

Con respecto a la actividad antioxidante hidrosoluble, en la figura 3A se aprecia como esta aumentó a lo largo del almacenamiento, siendo el tratamiento con GABA el que mayores valores alcanzó (86,60 ± 4,90 mg eq. Trolox 100 g^{-1}) en el tercer muestreo. Asimismo, se observó un descenso general en la actividad antioxidante liposoluble durante el almacenamiento, siendo el tratamiento con GABA el que mantiene una mayor actividad al final del estudio (24,68 ± 1,02 mg eq. Trolox 100 g^{-1}) de forma significativa. En general, la actividad antioxidante está influenciada por el estado de madurez del fruto, se ha comprobado que la actividad antioxidante hidrofílica tiende a mantenerse estable en etapas avanzadas de la maduración, adicionalmente, el 1-MCP ha reducido la actividad antioxidante lipofílica en algunos tipos de tomate, mientras que no afectó a la hidrofílica (Thwin et al., 2020). Además, y en consonancia con nuestros resultados, el GABA fue capaz de potenciar los sistemas antioxidantes en tomates Cherry (Rabiei et al., 2019).

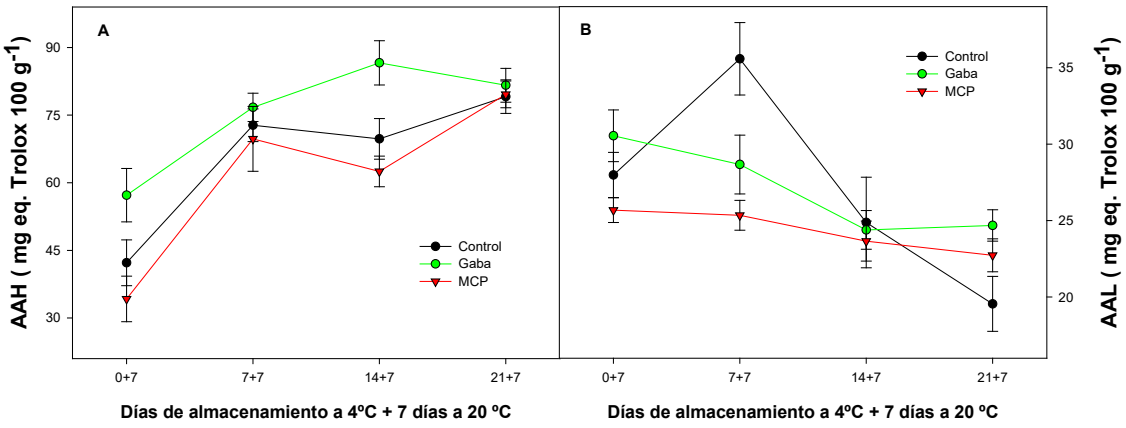


Figura 3. (A) Evolución de la actividad antioxidante hidrosoluble (mg eq. Trolox 100 g^{-1}) y (B) actividad antioxidante liposoluble (mg eq. Trolox 100 g^{-1}), en los tomates control y los tratados con GABA y 1-MCP durante el almacenamiento a 4ºC ± 7 días a 20ºC. Los valores medios ± ES seguidos de distintas letras son estadísticamente diferentes para p<0,05 en cada día de muestreo.

El contenido en carotenoides (Figura 4A) se asocia con la coloración rojiza del tomate, es por esto que se observa un mayor contenido en los tomates del grupo control y los tratados con GABA, y un menor contenido en los grupos tratados con MCP. Aunque al final del almacenamiento se aproximó el contenido en carotenoides de todos los lotes existieron diferencias significativas (P < 0.05) entre los tratamientos a lo largo del estudio. Respecto al contenido en flavonoides (Figura 4B), observamos que se produce un aumento general durante el almacenamiento, siendo el tratamiento con GABA el que presentó un mayor contenido en flavonoides durante la mayor parte de los muestreos. El licopeno es el carotenoide más destacado del tomate y para su acumulación es necesaria la presencia de etileno, es por esto que en los tratamientos basados en 1-MCP se produce un mayor retraso en la acumulación de carotenoides (Thwin et al., 2020). Park et al., (2016) demostraron que el tratamiento con 1-MCP no tiene efectos significativos sobre el contenido en flavonoides, sin embargo, Rastegar et al., (2020) indicaron que el tratamiento con GABA sí es capaz de aumentar el contenido en flavonoides cuando se aplica como tratamiento postcosecha en el mango.

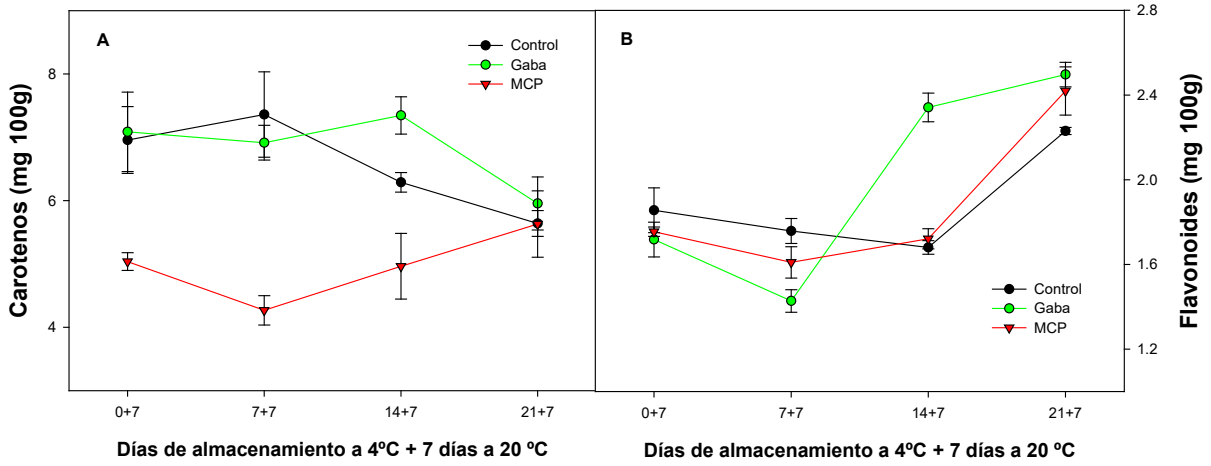


Figura 4. (A) Evolución del contenido en carotenos (mg 100 g^{-1}) y (B) el contenido en flavonoides (mg 100 g^{-1}), en los tomates control y los tratados con GABA y 1-MCP durante el almacenamiento a 4ºC ± 7 días a 20ºC. Los valores medios ± ES seguidos de distintas letras son estadísticamente diferentes para p<0,05 en cada día de muestreo.

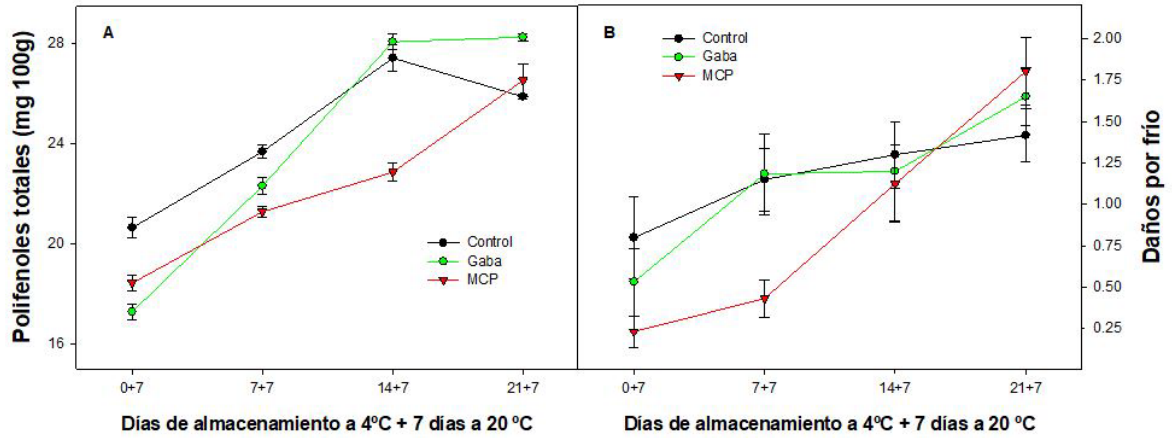


Figura 5. (A) Evolución del contenido en polifenoles totales (mg 100 g-1) y (B) los daños por frío, en los tomates control y los tratados con GABA y 1-MCP durante el almacenamiento a 4ºC ± 7 días a 20ºC. Los valores medios ± ES aquí representados seguidos de distintas letras son estadísticamente diferentes para p<0,05 en cada día de muestreo.

El contenido en polifenoles (Figura 5A) fue aumentando a lo largo de los distintos muestreos, sin embargo, fue el grupo tratado con GABA el que obtuvo un mayor contenido al final del almacenamiento (28,26±0,13 mg 100g-1). Estos resultados difieren de los descritos por Park et al., (2016), donde se observó que el tratamiento con 1-MCP fue capaz de aumentar el contenido en polifenoles. Por otro lado, Rastegar et al., (2020) observaron que el tratamiento con GABA potencia el contenido en polifenoles del mango. Finalmente, los daños por frío (Figura 5B) aumentaron en todos los lotes a lo largo del estudio. Sin embargo, el tratamiento con 1-MCP presentó un mayor efecto a la hora de reducir la sensibilidad a estos daños, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al resto de tratamientos. En estudios anteriores se ha observado como el tratamiento con GABA ayuda a mantener la integridad de las membranas, reduciendo la rigidez de las mismas producida por la exposición a las bajas temperaturas, reduciendo la fuga de electrolitos durante el almacenamiento a temperaturas sub-óptimas (Habibi et al., 2019).

Conclusiones

Tras el estudio de los resultados obtenidos podemos concluir que el tratamiento con sustancias de origen natural es limitado frente condiciones de almacenamiento refrigerado sub-óptimas aunque es capaz de incrementar los compuestos bioactivos de los tomates de forma significativa. Asimismo, los tratamientos con 1-MCP han demostrado efectos positivos con respecto al mantenimiento de la vida útil incluso reduciendo los daños por frío, aunque no tuvo efectos positivos sobre el contenido en compuestos bioactivos y la actividad antioxidante. Por todo ello, es posible que un tratamiento combinado entre ambos compuestos pudiera derivar en un incremento de la calidad debido a las acciones positivas que ejercen en los tomates ambos tratamientos por separado.

Bibliografía

Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophyll a and b in plant extracts. Protochem and Photobiol 2: 241-249. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1963.tb08220.x

Bu, S., Munir, S., He, P., Li, Y., Wu, Y., Li, X., He, Y. 2021. *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by Botrytis cinerea. Biological Control, 157, 104568. 10.1016/j.biocontrol.2021.104568

Ding, C. K., Wang, C. Y., Gross, K. C., Smith, D. L. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis related protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Planta., 214, 895–901. https://doi.org/10.1007/s00425-001-0698-9

El Houda-Lezoul, N., Belkadi, M., Habibi, F., Guillén, F., 2020. Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in different organs of three medicinal plants. Molecules. 25(20), 4672 https://doi.org/10.3390/molecules25204672

Evangelista-Martínez, Z., Contreras-Leal, E. A., Corona-Pedraza, L. F., Gastélum-Martínez, É. 2020. Biocontrol potential of *Streptomyces sp*. CACIS-1.5 CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30(1), 1-10. https://doi.org/10.1186/s41938-020-00319-9

Fagundes, C., Moraes, K., Pérez-Gago, M. B., Palou, L., Maraschin, M., Monteiro, A. R. 2015. Effect of active modified atmosphere and cold storage on the postharvest quality of cherry tomatoes. Postharvest Biology and Technology, 109, 73-81. 10.1016/j.postharvbio.2015.05.017

Fraser, G. E., Jacobsen, B. K., Knutsen, S. F., Mashchak, A., Lloren, J. I. 2020. Tomato consumption and intake of lycopene as predictors of the incidence of prostate cancer: the Adventist Health Study-2. Cancer Causes & Control, 31(4), 341-351. 10.1007/s10552-020-01279-z

Gaikwad, S. S., Sakhale, B. K., Chavan, R. F. 2020. Effect of 1–MCP concentration, exposure time and storage temperature on post-harvest quality of mango fruit cv. Alphanso. Food Research, 4(3), 746-752. https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(3).289

Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D. 2007. Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening. Postharvest Biology and Technology., 43, 23–27. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.004

Habibi, F., Ramezanian, A., Rahemi, M., Eshghi, S., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D. 2019. Postharvest treatments with γ-aminobutyric acid, methyl jasmonate, or methyl salicylate enhance chilling tolerance of blood orange fruit at prolonged cold storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(14), 6408-6417. 10.1002/jsfa.9920

Habibi, F., Ramezanian, A., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D. 2020. Blood oranges maintain bioactive compounds and nutritional quality by postharvest treatments with γ-aminobutyric acid, methyl jasmonate or methyl salicylate during cold storage. Food chemistry, 306, 125634. 10.1016/j.foodchem.2019.125634

Han, S., Nan, Y., Qu, W., He, Y., Ban, Q., Lv, Y., Rao, J. 2018. Exogenous γ-aminobutyric acid treatment that contributes to regulation of malate metabolism and ethylene synthesis in apple fruit during storage. Journal of Agricultural and food chemistry, 66(51), 13473-13482. 10.1021/acs.jafc.8b04674

Hijaz, F., Nehela, Y., Killiny, N. 2018. Application of gamma-aminobutyric acid increased the level of phytohormones in Citrus sinensis. Planta, 248(4), 909-918. https://doi.org/10.1007/s00425-018-2947-1

Hijaz, F., Killiny, N. 2020. The use of deuterium-labeled gamma-aminobutyric (D 6-GABA) to study uptake, translocation, and metabolism of exogenous GABA in plants. Plant methods, 16(1), 1-9. https://doi.org/10.1186/s13007-020-00574-9

Huan, C., Zhang, J., Jia, Y., Jiang, T., Shen, S., Zheng, X. 2020. Effect of 1-methylcyclopropene treatment on quality, volatile production and ethanol metabolism in kiwifruit during storage at room temperature. Scientia Horticulturae, 265, 109266. 10.1016/j.scienta.2020.109266

Karlova, R., Chapman, N., David, K., Angenent, G. C., Seymour, G. B., de Maagd, R. A. 2014. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. Journal of Experimental Botany, 65(16), 4527-4541. https://doi.org/10.1093/jxb/eru316

Kim, S. H., Hwang, K. A., Choi, K. C. 2016. Treatment with kaempferol suppresses breast cancer cell growth caused by estrogen and triclosan in cellular and xenograft breast cancer models. The Journal of nutritional biochemistry, 28, 70-82. 10.1016/j.jnutbio.2015.09.027

Li, S., Chen, K., Grierson, D. 2019. A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening. New Phytologist, 221(4), 1724-1741. https://doi.org/10.1111/nph.15545

Liu, Y., Sun, Y., Ye, M., Zhu, L., Zhang, L., Zhu, S. 2021. Improvement in storage quality of postharvest tomato fruits by Nitroxyl liposomes treatment. Food Chemistry, 129933. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129933

Livingstone, T. L., Beasy, G., Mills, R. D., Plumb, J., Needs, P. W., Mithen, R., Traka, M. H. 2019. Plant Bioactives and the Prevention of Prostate Cancer: Evidence from Human Studies. Nutrients, 11(9), 2245. https://dx.doi.org/10.3390%2Fnu11092245

Mata, C. I., Fabre, B., Parsons, H. T., Hertog, M. L., Van Raemdonck, G., Baggerman, G., Nicolaï, B. M. 2018. Ethylene receptors, CTRs and EIN2 target protein identification and quantification through parallel reaction monitoring during tomato fruit ripening. Frontiers in plant science, 9, 1626. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01626

Min, D., Li, Z., Ai, W., Li, J., Zhou, J., Zhang, X., Guo, Y. 2020. The co-regulation of ethylene biosynthesis and ascorbate–glutathione cycle by methy jasmonate contributes to aroma formation of tomato fruit during postharvest ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(39), 10822-10832. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04519

Obata, T., Fernie, A. R. 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. Cellular and Molecular Life Sciences, 69(19), 3225-3243. https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00018-012-1091-5

Palma, F., Carvajal, F., Jiménez-Muñoz, R., Pulido, A., Jamilena, M., Garrido, D. 2019. Exogenous γ-aminobutyric acid treatment improves the cold tolerance of zucchini fruit during postharvest storage. Plant physiology and biochemistry, 136, 188-195. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.023

Park, C. Y., Kim, Y. J., Shin, Y. 2016. Effects of an ethylene absorbent and 1-methylcyclopropene on tomato quality and antioxidant contents during storage. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 57(1), 38-45. 10.1007/s13580-016-0130-9

Park, M. H., Kim, S. J., Lee, J. S., Hong, Y. P., Chae, S. H., Ku, K. M. 2021. Carbon Dioxide Pretreatment and Cold Storage Synergistically Delay Tomato Ripening through Transcriptional Change in Ethylene-Related Genes and Respiration-Related Metabolism. Foods, 10(4), 744. https://doi.org/10.3390/foods10040744

Peralta-Ruiz, Y., Tovar, C. D. G., Sinning-Mangonez, A., Coronell, E. A., Marino, M. F., Chaves-Lopez, C. 2020. Reduction of postharvest quality loss and microbiological decay of tomato "chonto" (*Solanum lycopersicum* L.) Using chitosan-e essential oil-based edible coatings under low-temperature storage. Polymers, 12(8), 1822. https://doi.org/10.3390/polym12081822

Rabiei, V., Kakavand, F., Zaare-Nahandi, F., Razavi, F., Aghdam, M. S. 2019. Nitric oxide and γ-aminobutyric acid treatments delay senescence of cornelian cherry fruits during postharvest cold storage by enhancing antioxidant system activity. Scientia Horticulturae, 243, 268-273. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.034

Rastegar, S., Khankahdani, H. H., Rahimzadeh, M. 2020. Effect of γ-aminobutyric acid on the antioxidant system and biochemical changes of mango fruit during storage. Journal of Food Measurement and Characterization, 14(2), 778-789. 10.1007/s11694-019-00326-x

Safari, Z. S., Ding, P., Juju Nakasha, J., Yusoff, S. F. 2020. Combining chitosan and vanillin to retain postharvest quality of tomato fruit during ambient temperature storage. Coatings, 10(12), 1222. https://doi.org/10.3390/coatings10121222

Serrano, M., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D. 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 3240-3246. https://doi.org/10.1021/jf803949k

Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T., Matsubayashi, T. 2009. Anti-hypertensive effect of γ-aminobutyric acid (GABA)-rich Chlorella on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. Clinical and experimental hypertension, 31(4), 342-354. 10.1080/10641960902977908

Shinozaki, Y., Nicolas, P., Fernandez-Pozo, N., Ma, Q., Evanich, D. J., Shi, Y., Ruiz-May, E. 2018. High-resolution spatiotemporal transcriptome mapping of tomato fruit development and ripening. Nature communications, 9(1), 1-13. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02782-9

Thwin, Y. W., Chang, M. S., Hong, Y., Lim, S. 2020. Effects of 1-MCP and calcium chloride treatments on quality maintenance of full-ripe cherry tomatoes. Journal of the Korean Food Storage and Distribution Society, 27(4), 433-445. 10.11002/kjfp.2020.27.4.433

Tohge, T., Alseekh, S., Fernie, A. R. 2013. On the regulation and function of secondary metabolism during fruit development and ripening. Journal of Experimental Botany, 65(16), 4599-4611. 10.1093/jxb/ert443

Xu, F., Liu, S., Liu, Y., Xu, J., Liu, T., Dong, S. 2019. Effectiveness of lysozyme coatings and 1-MCP treatments on storage and preservation of kiwifruit. Food chemistry, 288, 201-207. 10.1016/j.foodchem.2019.03.024

Zhao, Q., Jin, M., Guo, L., Pei, H., Nan, Y., Rao, J. 2020. Modified atmosphere packaging and 1-methylcyclopropene alleviate chilling injury of 'Youhou' sweet persimmon during cold storage. Food Packaging and Shelf Life, 24, 100479. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100479

Zhou, J., Chen, B., Albornoz, K., Beckles, D. M. 2021. Postharvest handling induces changes in fruit DNA methylation status and is associated with alterations in fruit quality in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Scientia Horticulturae, 283, 110090. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110090

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Aplicación de tratamientos post-cosecha para incrementar la calidad durante el almacenamiento de aguacate (*Persea americana* M.)

M.I.M. Ilea, M.C. Ruiz-Aracil, J.M. Valverde, M. Nicolás-Almansa, F. Guillén

Dept. Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, e-mail: mihaela.ilea@alu.umh.es

Resumen

Las frutas tropicales en general son productos con una vida útil corta, debido principalmente a la deshidratación y ablandamiento que sufren estos frutos durante su almacenamiento en postcosecha. La refrigeración es una herramienta útil a la hora de preservar frutas tropicales, sin embargo y pese a los beneficios que las bajas temperaturas conllevan sobre la vida útil, estas suelen provocar en las frutas tropicales en general y en el aguacate en particular desórdenes fisiológicos. La elevada sensibilidad que presentan los aguacates a las bajas temperaturas da lugar importantes daños tanto en la piel como en el interior del fruto. En la piel, el colapso de los tejidos incrementa las pérdidas de peso imposibilitando la comercialización al igual que los pardeamientos internos provocados por la refrigeración. En este trabajo evaluamos el efecto en la reducción de estos daños por distintos tratamientos aplicados en aguacates almacenados a temperaturas sub-óptimas (5°C). Para ello comparamos la extensión de vida útil mediante la aplicación de sustancias artificiales de síntesis (1-MCP) o con la aplicación de compuestos de origen natural (N-acetil-5-metoxitriptamina), ambos con actividad demostrada frente a las alteraciones que las bajas temperaturas pueden provocar en otros productos vegetales. Los tratamientos aplicados de forma independiente mejoraron varios parámetros de la calidad general del fruto como las pérdidas de peso, firmeza o color de los frutos, en comparación con los controles durante el almacenamiento, controlando además la incidencia de los daños causados por la conservación frigorífica ensayada. Además, los elicitores naturales aplicados incrementaron el contenido en compuestos bioactivos presentes en estos frutos en comparación con los frutos controles o los tratados con sustancias de origen artificial. Por tanto, la utilización de compuestos de origen natural podría sustituir los compuestos de origen artificial ampliamente utilizados en la comercialización de estos frutos, mejorando la sostenibilidad, ya que estos compuestos son propios de los tejidos de la planta.

Palabras clave: Vida útil, polifenoles, refrigeración, comercialización, metabolismo

Application of post-harvest treatments to increase quality during avocado storage (*Persea americana* M.)

Abstract

Tropical fruits in general have a short shelf life, mainly due to the dehydration and softening that these fruits undergo during postharvest storage. Refrigeration is a useful tool for preserving tropical fruits; however, despite the benefits that low temperatures have on shelf life, they tend to cause physiological disorders in tropical fruits in general and in avocados. The high sensitivity of avocados to low temperatures results in significant damage to both the skin and the interior of the fruit. In the skin, the collapse of tissues increases weight loss, making the commercialization impossible, as well as internal browning caused by refrigeration. In this study, we evaluated the effect on the reduction of these damages by different treatments applied to avocados stored at suboptimal temperatures (5°C). For this purpose, we compared the extension of shelf life by the application of artificial synthetic substances or by the application of compounds of natural origin, both with efficient proven activity against the alterations that low temperatures can cause in other vegetable products. The treatments applied independently improved several parameters of the general quality of the fruit compared to the controls during storage, also controlling the incidence of damage caused by the cold storage tested. In addition, the natural elicitors applied increased the content of bioactive compounds present in these fruits compared to controls or those treated with substances of artificial origin. Therefore, the use of compounds of natural origin could replace compounds of

artificial origin widely used in the commercialization of these fruits, improving sustainability, since these compounds are native to plant tissues.

Key words: Shelf life, polyphenols, refrigeration, commercialization, metabolism

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una fruta subtropical originaria de México y Centroamérica, y ampliamente producida y consumida en todo el mundo. Pertenece a la familia *Lauraceae* y al género *Persea*, del que se conocen más de 150 especies (Araújo et al., 2018). Es importante mencionar que el aguacate es un fruto climatérico, lo que significa que tiene una alta tasa de respiración y una abundante producción de etileno durante su maduración, por lo tanto, puede madurar tras la cosecha, lo que supone una desventaja para su comercialización al verse afectada su vida útil y también su calidad comercial.

El almacenamiento en frío es el tratamiento más eficaz para retrasar la maduración de la fruta, logrando ralentizar el proceso de respiración, además de controlar la salida de CO_2 interno y la entrada del oxígeno externo (Arpaia et al., 2015). Es importante mencionar que los aguacates, tras la cosecha tardan entre 5 y 7 días en madurar completamente a temperatura ambiente (Ozdemir y Topuz, 2004). De hecho, se ha observado que, por cada 10 °C de disminución en la temperatura de almacenamiento, la respiración se reduce a la mitad, observándose también una menor metabolización de ciertos compuestos (azúcares y la materia orgánica), así como también una ralentización en la producción de etileno (Bill et al., 2014).

Por otra parte, aunque las ventajas del almacenamiento refrigerado son innegables, las temperaturas de almacenamiento sub-óptimas pueden causar daños y pérdidas de calidad en los frutos. El oscurecimiento del mesocarpio durante el almacenamiento en frío es uno de los síntomas de daño por frío que se manifiestan en los frutos de aguacate causando importantes pérdidas de exportación cada año (Lelyveld y Bower, 1984). Para abordar este problema es necesario controlar las condiciones de almacenamiento y maduración de la fruta (Munhuweyi et al., 2020) ya que esto también puede ser una consecuencia de daños por frío (Arpaia et al., 2018).

La aplicación de tratamientos post-cosecha con la finalidad de regular el crecimiento y la maduración durante el almacenamiento y el transporte de los aguacates es una importante herramienta, con un alto impacto en la vida útil de estos frutos. Por este motivo en condiciones comerciales, el almacenamiento refrigerado se combina con tratamientos postcosecha como el 1-metilciclopropeno (1-MCP), una formulación gaseosa que se aplica a la fruta de forma comercial desde hace años. Su uso logra retrasar la tasa de respiración, la pérdida de peso, la decoloración fisiológica del mesocarpio asociada al etileno (pulpa gris) y los daños por frío internos, además de influir en la reducción de las infecciones fúngicas y en el aumento del contenido de antioxidantes durante el almacenamiento de la fruta (Munhuweyi et al., 2020). Además se han estudiado distintos tratamientos postcosecha como los tratamientos térmicos mediante inmersión en agua caliente, alargando la vida útil y reduciendo los daños por frío (Setagane et al., 2021) así como también minimizando el impacto de los insectos (Hofman et al., 2002). Algunos de estos tratamientos están basados en elicitores. Los elicitores son sustancias que provocan un cambio fisiológico en la planta con la finalidad de activar una serie de mecanismos de reacción, parecidos a las respuestas de defensa, aumentando de esta forma la síntesis de compuestos fitoquímicos en su metabolismo que son beneficiosos al tener una función de protección contra los posibles daños que esta pueda sufrir (Pandi-Perumal et al., 2006).

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) que es una hormona secretada en la glándula pineal, puede ser utilizada como elicitor en los tratamientos post-cosecha. Su presencia en plantas fue descrita por primera vez en el año 1995 por Dubbels et al., (1995) siendo una reguladora del crecimiento. Estudios recientes como el descrito por Wang et al., (2020) afirman que la melatonina endógena participa tanto en la defensa como en el crecimiento de la fruta y que su concentración varía durante el desarrollo de la fruta, disminuyendo durante la maduración. Por otra parte, la aplicación de la melatonina exógena logró aumentar la biosíntesis de aquella endógena, además de aumentar los niveles de los compuestos

fenólicos, así como también el número de los frutos, el peso y el rendimiento general (Arnao et al., 2019). De esta forma, la melatonina es capaz de reducir el estrés oxidativo reduciendo los daños por frío y retrasando la senescencia (Zhao et al., 2016).

En este estudio, tratamos de dilucidar las posibilidades de la melatonina sobre los daños por frío y la vida útil del aguacate en comparación a compuestos de origen artificial como es el 1-MCP ampliamente utilizado de forma comercial en la postcosecha de este y otros frutos.

Materiales y Métodos

Los aguacates cv. Hass (*Persea americana* Mill.) objeto de este estudio fueron recolectados en una finca comercial de Granada, y rápidamente fueron transportados hasta el laboratorio, el mismo día de la recolección. En el laboratorio se procedió a seleccionar la fruta teniendo en cuenta una serie de características y parámetros como son el tamaño, la ausencia de defectos, y el color de cada pieza. Tras la selección de 96 aguacates, los frutos se agruparon en lotes o tratamientos de 12 aguacates divididos en tres muestras de 4 aguacates cada uno. Además, se seleccionaron otros doce frutos para evaluar el día 0 y establecer así las condiciones en que los aguacates llegaron al laboratorio. Los tratamientos aplicados fueron inmersiones con distintas soluciones (agua destilada o bien melatonina 0,05 y 0.5 mM) sometiendo a los frutos a dos distintos tiempos de inmersión (10 y 60 min). Estos además se compararon con otros lotes tratados con 1-MCP (300 ppb). La dosis de 1-MCP óptima en estos frutos fue escogida de entre las ensayadas en esta variedad por Defilippi et al., (2018).

Los tratamientos con 1-MCP se realizaron mediante la utilización de pastillas comerciales liberadoras de este compuesto a las dosis aplicadas, todo proporcionado por SmartFresh (AgroFresh Inc., Philadelphia, PA) en contenedores herméticos de 130 L. Todos los frutos se almacenaron a 5 °C con una humedad relativa del 90 % para ser posteriormente muestreados tras diversos periodos de almacenamiento en frío más dos días más a 20 °C.

La respiración y el etileno se determinaron mediante sistema estático en cada lote; el peso, y la firmeza del fruto entero, se determinaron individualmente en cada aguacate. Esta última se evaluó por duplicado en cada lado del aguacate mediante la aplicación de una deformación del 5%. Se realizaron dos medidas en cada uno de los lados del fruto (n = 24). La evaluación del color se determinó utilizando el sistema CIELAB (L*, a*, b*) por medio de un colorímetro triestímulo Minolta modelo CR200, realizándose tres medidas del color para cada fruto en tres puntos equidistantes longitudinalmente. Estos parámetros han sido evaluados siguiendo las indicaciones descritas por Serrano et al., (2009).

Los antocianos fueron evaluados en la piel y los polifenoles totales en la pulpa de los aguacates respectivamente, siguiendo los métodos descritos por García-Pastor et al., (2020). El contenido en clorofilas totales y en carotenoides se evaluó en la piel de los aguacates siguiendo el método y ecuaciones descritas por Arnon, (1949) y Bruinsma, (1963) para evaluar el contenido en los distintos pigmentos.

Los daños por frío en los aguacates se evaluaron en la pulpa de los mismos inmediatamente tras cortarlos por la mitad, de forma visual siguiendo las indicaciones descritas por Ding et al. (2002). Para ello se asignó una escala de 0 - 4 donde 0 = sin daños, 1 = menos de un 5% de la superficie afectada, 2 = 5-15% de la superficie, 3 = 16–25 % de la superficie y 4 = más de un 25% de la superficie. Se aplicó la siguiente ecuación para evaluar los daños por frío: $\sum$ (nivel de daño) x (número de frutos con ese nivel de daño) / Total nº frutos. Por otro lado, se evaluó de forma visual el número de frutos afectados por podredumbres y los resultados se expresaron cómo % de frutos afectados sobre el total de frutos bajo estudio. El experimento se llevó a cabo en un diseño completamente aleatorio. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) unifactorial y los datos se estudiaron utilizando el paquete de software SPSS v. 20.0. para Windows. Cuando las diferencias mostradas por las distintas muestras han resultado ser significativas ($p < 0.05$) los valores de las medias ± ES se compararon mediante el Test de Tuckey.

Resultados y Discusión

Tasa de Respiración y Producción de Etileno

La respiración de los frutos consiste en una serie de reacciones catalizadas por enzimas, cuya velocidad está relacionada con la temperatura. Las frutas y hortalizas, aunque su actividad fotosintética se interrumpa, respiran tras su recolección. Para obtener energía, los azúcares procedentes de la degradación del almidón se oxidan, formándose H_2O y CO_2 (Valero y Serrano, 2010). En los frutos climatéricos como el aguacate, se produce un incremento en la producción de etileno al inicio de la maduración y se considera que esta hormona es la que da lugar a los cambios en el color, aroma, textura, flavor y otros cambios bioquímicos relacionados con la maduración (Giovanonni, 2001).

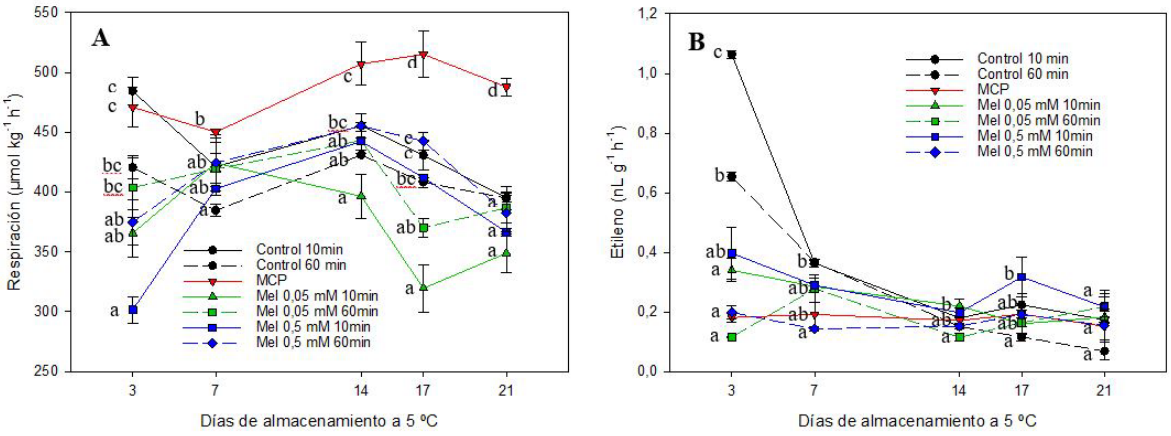


Figura 1. (A) Evolución de la respiración y (B) de la producción de etileno en los aguacates controles, tratados con 1-MCP y con distintas dosis de melatonina tras el almacenamiento refrigerado a 5°C. Los valores medios ± ES, seguidos de distintas letras en un mismo día de muestreo son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

En el día de la recolección, los valores de respiración y de producción de etileno fueron de 421,16 ± 32 µmol kg^{-1} h^{-1} y 0.51 ± 0,02 nL g^{-1} h^{-1} respectivamente y tras estudiar su evolución pudimos observar cómo en general la producción de CO_2 y la producción de etileno incrementaron ligeramente durante el almacenamiento (Figura 1). Especialmente en los frutos tratados con 1-MCP se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al resto de tratamientos. Algunas dosis de melatonina consiguieron reducir la producción de CO_2 y con ello ralentizar el metabolismo del fruto, al igual que lograron reducir la producción de etileno desde los primeros días del estudio (Figura 1A). La dosis más baja de melatonina (0,05 mM) durante el tiempo de aplicación más corto (10 minutos), fue la que más redujo la producción de CO_2 de forma significativa ($p < 0,05$) durante gran parte de los muestreos. En cuanto a la producción de etileno, las dosis de melatonina aplicadas fueron efectivas durante el almacenamiento en frío con producciones de etileno similares a las obtenidas en los frutos tratados con 1-MCP (Figura 1B). En un estudio reciente (Wang et al., 2020) se indica como la melatonina ha mostrado una alta eficacia sobre los frutos retrasando parámetros relacionados con la senescencia. Asimismo, en estudios anteriores se ha observado cómo la acción de la melatonina o de derivados metabólicos de esta, son capaces de reducir la actividad metabólica de los tejidos lo cual conlleva una menor producción de etileno (Han et al., 2020).

Pérdida de Peso y Firmeza

La pérdida de peso principalmente se debe a las pérdidas de agua durante la transpiración siendo una causa importante del deterioro del aguacate, dando lugar a pérdidas de calidad. Tras la recolección continúan los procesos de transpiración por el cual el agua, en estado de vapor, atraviesa las estomas y la epidermis provocándose la pérdida del peso del fruto (Valero y Serrano 2010).

Por otra parte, la textura de las frutas y hortalizas sufre transformaciones. Estos cambios en la textura están relacionados con la turgencia de los tejidos y, por tanto, con a la actividad hidrolítica de enzimas

que se encargan de degradar pectinas, celulosas y hemicelulosas de la pared celular (Paniagua et al., 2014).

Durante la evaluación de las pérdidas de peso se observó un incremento de este parámetro durante el almacenamiento. Sin embargo, cuando los frutos fueron tratados con melatonina a dosis 0,5mM pudimos comprobar un efecto en el incremento de las pérdidas de peso de los aguacates tratados a esta dosis (Figura 2A). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ninguno de los tratamientos aplicados incluso cuando los frutos fueron tratados con 1-MCP. En otros frutos se ha observado una reducción de la evolución de las pérdidas de peso en diferentes especies vegetales (Arnao y Hernández-Ruiz, 2019). Probablemente debidas en parte a una menor respiración celular y a una mayor integridad de los frutos tratados (Wang et al., 2020).

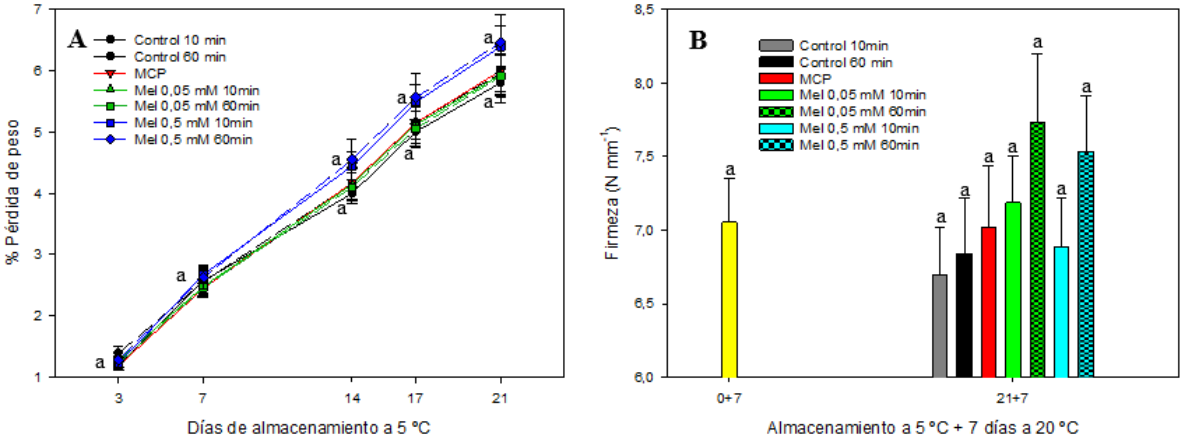


Figura 2. (A) Evolución de la pérdida de peso (%) y (B) de la firmeza (Nmm-1) en los aguacates controles, tratados con 1-MCP y con distintas dosis de melatonina durante el almacenamiento refrigerado y tras 7 días más a 20°C. Los valores medios ± ES, seguidos de distintas letras en un mismo día de muestreo son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Respecto a la firmeza (Figura 2B) observamos como los tratamientos con melatonina más exitosos a la hora de mantener los mayores niveles de firmeza, fue las dosis de melatonina de 0,05mM a un tiempo de inmersión de 10 minutos, seguida de la dosis 0,5 mM 10 min. No obstante, las diferencias no fueron significativas ($P < 0,05$) entre los distintos tratamientos aplicados. Diferentes autores han demostrado la acción de la melatonina estimulando la expresión de genes relacionados con la estructura de la pared celular (Sun et al., 2015; Zhai et al., 2018) reduciendo la degradación de sustancias pécticas, responsable del ablandamiento de los frutos.

Parámetros de color L* y a*

El parámetro de color a* hace referencia a una de las coordenadas cromáticas utilizadas en el espacio de color CIE L*a*b* y representa el eje rojo/verde, mostrando colores verdes en el eje negativo. El color L* a su vez representa la luminosidad del fruto en una escala de 0 (negro) a 100 (blanco) pudiendo relacionarse este parámetro con la pérdida de peso del fruto (Martínez-Romero et al., 2002).

Tras evaluar los resultados obtenidos con respecto a la evolución del color en los aguacates pudimos comprobar que tanto el parámetro L* como el parámetro a* fueron retrasados por algunas de las dosis de melatonina aplicadas. Con relación al parámetro L* (Figura 3A) los aguacates tratados con melatonina 0,5 mM durante 10 min y 0,05 mM durante 60 min mostraron los mejores resultados, sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p < 0,05$). En cuanto al parámetro a* (Figura 3B) que nos remite a las tonalidades verdosas cuanto más negativos son los valores que presenta este parámetro, pudimos comprobar que los tratamientos con melatonina aplicados a la más baja de las concentraciones fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) con respecto a los frutos tratados con 1-MCP y controles. Distintos estudios describen la capacidad de la melatonina retrasando la evolución del color tanto cuando esta es aplicada en precosecha (Medina-Santamarina et al., 2021) o como tratamiento postcosecha

(Arnao y Hernández-Ruiz, 2019). De igual forma, el 1-MCP ha demostrado su impacto en el retraso de los parámetros de color, principalmente debido a la menor producción de etileno (Guillen et al., 2006; Gaikwad et al., 2020).

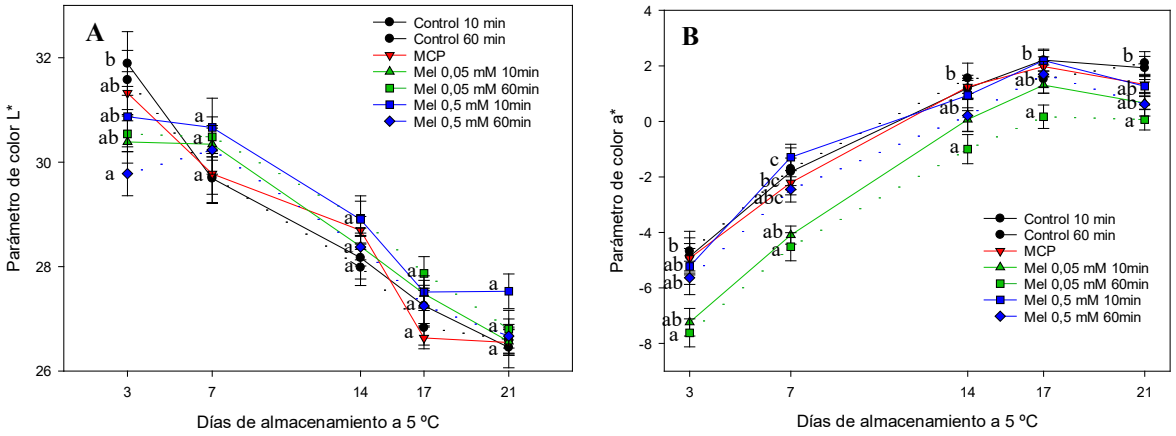


Figura 3. (A) Evolución del parámetro de color L* y (B) del parámetro de color a*, en la piel de los aguacates controles, tratados con 1-MCP y con distintas dosis de melatonina tras el almacenamiento refrigerado a 5°C. Los valores medios ± ES, seguidos de distintas letras en un mismo día son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Compuestos Bioactivos

Queda demostrada la presencia de los compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas en los frutos de aguacates, donde destacan los compuestos fenólicos como son los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos hidroxibenzoicos, los flavonoides y proantocianinas, así como también las acetogeninas, los fitoesteroles, los carotenoides y los alcaloides (Salazar-López et al., 2020).

Antocianos y Clorofilas Totales

Aunque en el día de la recolección no se detectaron antocianinas en la piel de los aguacates, los niveles de clorofilas totales de los frutos fueron de 67,02 ± 1,58 mg 100 g^{-1}. Sin embargo, a lo largo del almacenamiento refrigerado más 7 días a 20 ºC incrementaron las antocianinas y disminuyó el contenido en clorofilas (Figura 4) especialmente en los frutos control de forma muy significativa ($p < 0,05$) con respecto al resto de tratamientos.

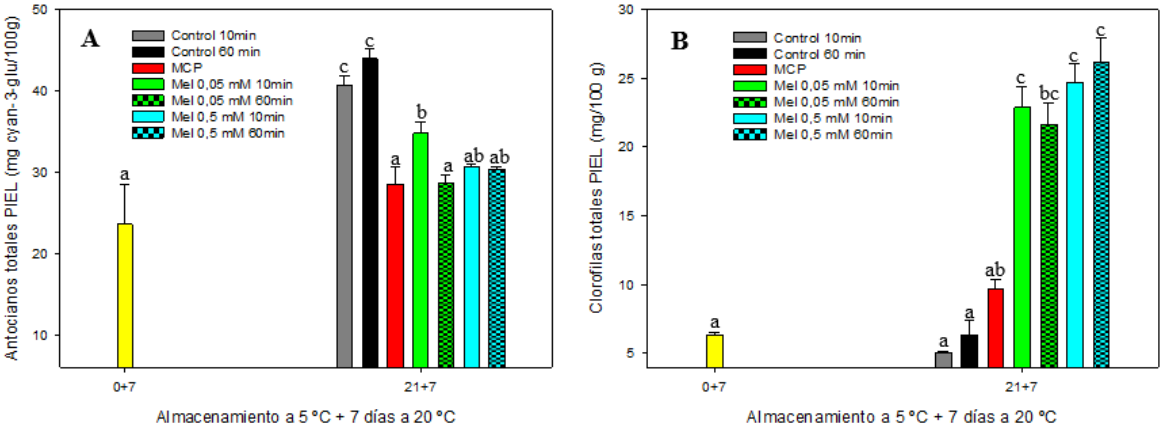


Figura 4. (A) Evolución de la concentración de antocianinas (mg/100g) y (B) de clorofilas (mg/100g1) en la piel de los aguacates controles, tratados con 1-MCP y con distintas dosis de melatonina tras el almacenamiento refrigerado a 5°C más 7 días a 20°C. Los valores medios ± ES, seguidos de distintas letras en un mismo día de muestreo son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

La concentración de antocianinas de la piel de los aguacates está relacionada también con una mayor coloración oscura de la misma. Así, podemos observar un aumento en todos los frutos conforme incrementó el tiempo de almacenamiento. Además, se observó un retraso en la acumulación de estos compuestos en aquellos aguacates tratados con las distintas dosis de melatonina, y con 1-MCP en comparación con las muestras control (Figura 4A). Las diferencias no fueron significativas ($P < 0,05$) en general entre los frutos tratados con 1-MCP o elicitores naturales. Por otra parte, en cuanto a la concentración de las clorofilas totales en las muestras tratadas (Figura 4B), únicamente fueron los tratamientos con melatonina a las distintas concentraciones y tiempos de inmersión los que mayores niveles de clorofila mantuvieron hacia el final del experimento ($P < 0,05$). Los cloroplastos son muy sensibles a las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, la melatonina es capaz de incrementar la actividad de los sistemas antioxidantes manteniendo estas estructuras. La estimulación de los sistemas antioxidantes controlaría estas especies reactivas de oxígeno, como se ha descrito en otros tejidos vegetales tras el tratamiento con melatonina por Zhao et al., (2017).

Polifenoles y Carotenos Totales

El contenido en carotenoides y polifenoles totales el día de la recolección fue de 14,48 ± 1,18 mg 100 g-1 y de 55,80 ± 0,91 mg 100 g-1. No obstante, tras el almacenamiento refrigerado y 7 días más a 20ºC este contenido se redujo en ambos parámetros. Con respecto al contenido en carotenoides (Figura 5A) esta reducción se produjo de forma significativa ($P < 0,05$) especialmente para los frutos controles o tratados con 1-MCP en comparación al resto de tratamientos. Así, observamos un mantenimiento de su concentración inicial en todos los tratamientos aplicados con melatonina al final del estudio, pero sin observarse diferencias significativas entre las distintas dosis o tiempos de aplicación.

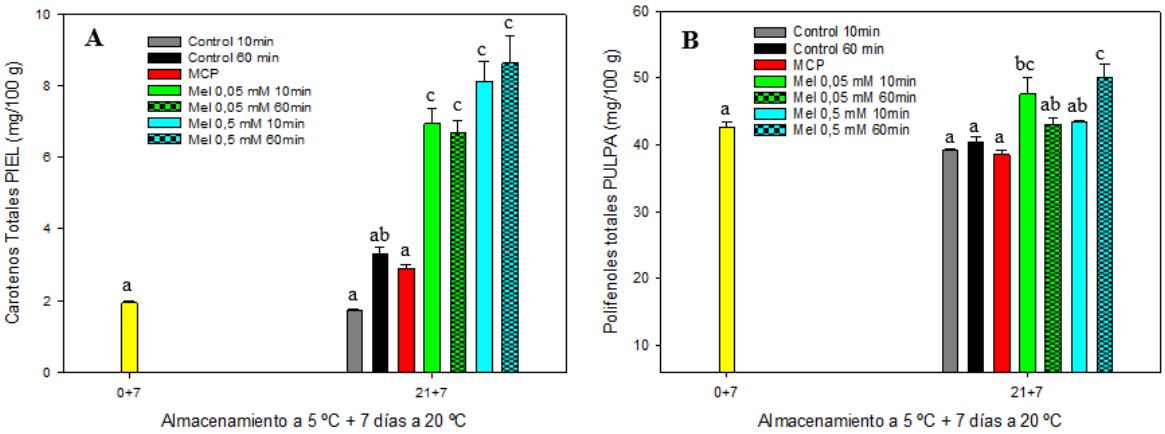


Figura 5. (A) Evolución de la concentración de carotenos en la piel (mg/100g) y (B) de polifenoles (mg/100g1) totales en la pula de los aguacates controles, tratados con 1-MCP y con distintas dosis de melatonina tras el almacenamiento refrigerado a 5°C más 7 días a 20°C. Los valores medios ± ES, seguidos de distintas letras en un mismo día de muestreo son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Con respecto a la concentración de polifenoles totales en la pulpa de los aguacates (Figura 5B), observamos que, pese a que sus niveles se redujeron en los distintos días de muestreo, mantuvieron de forma significativa mayor contenido de polifenoles totales cuando se trataron con melatonina a las dosis de 0,05mM y 0,5mM durante 10 o 60 min, respectivamente. La mayor concentración de polifenoles totales en los aguacates con melatonina podría atribuirse a una reducción en la actividad de la enzima polifenol-oxidasa (PPO), combinado con el aumento de la actividad antioxidante, como se ha descrito en otras especies (Aghdam y Fard, 2017; Arnao y Hernández-Ruiz, 2019).

Daños por frío y presencia de podredumbres

Como los aguacates son frutos sensibles a las bajas temperaturas, se suelen observar daños por frío al intentar alargar la vida útil de éstos mediante la reducción de la temperatura. Estos daños se suelen

presentar como pardeamientos en la superficie del fruto y suelen producirse en la variedad "Hass" a temperaturas sub-óptimas (Woolf et al., 2003).

Una vez examinados los resultados obtenidos, pudimos observar que los daños por frío se manifestaron de forma significativa en los frutos controles mientras que los tratamientos con 1-MCP y con melatonina tuvieron un efecto similar en retrasar la aparición de esta fisiopatía. De hecho, y teniendo en cuenta los valores medios, la incidencia de estos daños fue reducida significativamente ($P < 0,05$) especialmente cuando se aplicaron distintas concentraciones de melatonina (Figura 6A). La melatonina es capaz de mantener la fluidez de la membrana celular, disminuyendo la oxidación celular (Arnao y Hernández-Ruíz, 2019). Este hecho retrasaría el colapso de las células y la aparición de los daños oxidativos resultantes.

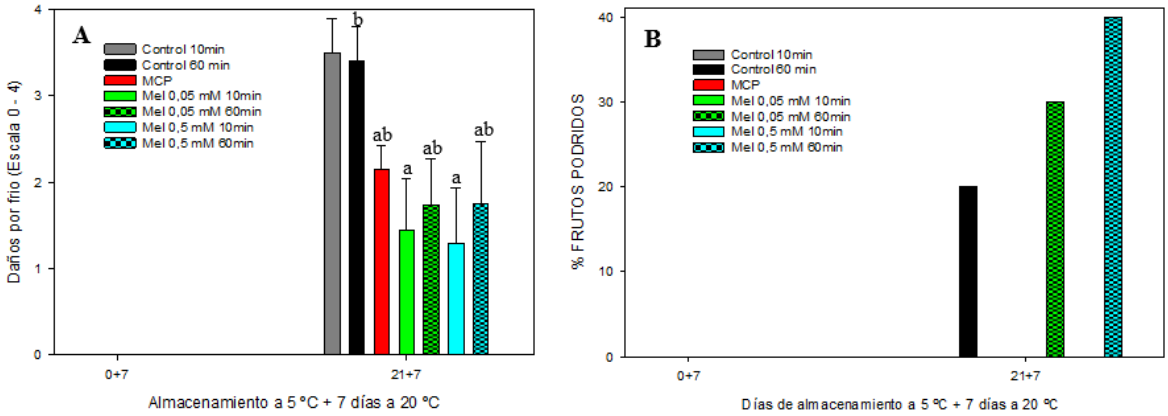


Figura 6. (A) Evolución de los daños por frío (escala 0-4) y (B) del porcentaje de frutos podridos (%) en los aguacates controles, tratados con 1-MCP y con distintas dosis de melatonina tras el almacenamiento refrigerado a 5°C más 7 días a 20°C. Los valores medios ± ES, seguidos de distintas letras en un mismo día de muestreo son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Además, en el aguacate y en otros frutos tropicales se ha observado como la reducción en los daños por frío estaba relacionada con una menor producción de etileno por parte del fruto (Selvarajah et al., 2001; Pesis et al., 2002), por lo que la reducción del etileno observado anteriormente en los frutos tratados con melatonina también podría estar relacionada con el menor impacto de los daños por frío. En cuanto a la aparición de podredumbres, se observó que estas aparecieron cuando se aplicaron los tiempos de inmersión de 60 minutos (Figura 6B). La vida útil del aguacate se ve comprometida por la susceptibilidad a los hongos fitopatógenos que causan el deterioro después de la cosecha es uno de ellos (Pompa et al., 2009). Las principales enfermedades del fruto del aguacate incluyen la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y las podredumbres del corte del tallo causadas principalmente por *Lasiodiplodia theobromae* (Zentmyer et al., 1984).

Conclusiones

No existen estudios anteriores que evalúen el efecto de la melatonina sobre la calidad de los aguacates, pero nuestros resultados nos permiten concluir que el tratamiento con elicitores como la melatonina sobre la calidad del aguacate son una buena herramienta para mantener la calidad de estos frutos frente temperaturas sub-óptimas. Aunque los tratamientos con sustancias de origen artificial como el 1-MCP han demostrado un efecto similar frente a los daños por frío, sólo fue capaz de retrasar la maduración de forma parcial comparado con los distintos efectos positivos producidos por las aplicaciones con melatonina. Además, estos elicitores son sustancias naturales e inocuas a las dosis aplicadas, por lo que la melatonina podría ser una alternativa eficaz y natural que incrementaría la vida útil de estos productos tropicales.

Bibliografía

Aghdam, M. S., & Fard, J. R., 2017. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria* × *anannasa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity. Food Chemistry, 221, 1650–1657. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.123

Araújo, R., Rodriguez-Jasso, R., Ruiz, H., Pintado, M., & Aguilar, C., 2018. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. Trends in Food Science & Technology, 80. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027

Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2019. Melatonin: A New Plant Hormone and/or a Plant Master Regulator. Trends in Plant Science, 24(1), pp. 38-4 https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.010

Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 1-15. https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1

Arpaia, M. L., Collin, S., Sievert, J., & Obenland, D., 2015. Influence of cold storage prior to and after ripening on quality factors and sensory attributes of 'Hass' avocados. Postharvest Biology and Technology, 110, 149–157.

Arpaia, M. L., Collin, S., Sievert, J., & Obenland, D., 2018. 'Hass' avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. Postharvest Biology and Technology, 140, 76–84. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.015

Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L. and Thompson, A.K., 2014. The Efficacy of Combined Application of Edible Coatings and Thyme Oil in inducing Resistance Components in Avocado (*Persea americana* Mill.) against Anthracnose during Post-Harvest Storage. Crop Protection, 64,159-167.

Bruinsma, J., 1963. The quantitative analysis of chlorophyll a and b in plant extracts. Protochem and Photobiol, 2, 241-249. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1963.tb08220.x

Defilippi, B.G., Ejsmentewicz, T., Covarrubias, M.P., Gudenschwager, O., Campos-Vargas. R.,2018. Changes in cell wall pectins and their relation to postharvest mesocarp softening of "Hass" avocados (*Persea americana* Mill.) Plant Physiology and Biochemistry, 128, 142-151. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.018

Ding, C. K., Wang, C. Y., Gross, K. C., Smith, D. L., 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis related protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Planta, 214, 895–901.

Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schloot, W., 1995. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performane liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Pineal Research, 18(1), 28-31. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1995.tb00136.x

Gaikwad, S. S., Sakhale, B. K., Chavan, R. F., 2020. Effect of 1–MCP concentration, exposure time and storage temperature on post-harvest quality of mango fruit cv. Alphanso. Food Research, 4(3), 746-752.

García-Pastor, M. E., Serrano, M., Guillén, F., Giménez, M. J., Martínez-Romero D., Valero, D., Zapata, P. J., 2020. Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. J. Sci. Food Agric., 100(1), 145-153.

Giovannoni, J., 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 52, 725-749. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.725

Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P. J., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., 2006. Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit: 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. Postharvest Biology and Technology, 42(3), 235-242. http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.005

Han, S., Liu, H., Han, Y., He, Y., Nan, Y., Qu, W., Rao, J., 2020. Effects of calcium treatment on malate metabolism and γ-aminobutyric acid (GABA) pathway in postharvest apple fruit. Food Chem., 334, 127479.

Hofman, P. J., Stubbings, B. A., Adkins, M. F., Meiburg, G. F., & Woolf, A. B., 2002. Hot water treatments improve 'Hass' avocado fruit quality after cold disinfestation. Postharvest Biology and Technology, 24(2), 183–192. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00131-4

Lelyveld, L. J. Van, & Bower, J. P., 1984. Enzyme reactions leading to avocado fruit mesocarp discoloration. Journal of Horticultural Science, 59(2), 257–263. https://doi.org/10.1080/00221589.1984.11515195

Martínez-Romero, D., Serrano, M., Carbonell, A., Burgos, L., Riquelme, F., Valero, D., 2002. Effects of postharvest putrescine treatment on extending shelf life and reducing mechanical damage in apricot. J. Food Sci. 67, 1706-1712. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08710.x

Medina-Santamarina, J., Zapata, P. J., Valverde, J. M., Valero, D., Serrano, M., Guillén, F., 2021. Melatonin treatment of apricot trees leads to maintenance of fruit quality attributes during storage at chilling and non-chilling temperatures. Agronomy, 11, 917. https://doi.org/10.3390/agronomy11050917

Munhuweyi, K., Mpai, S., & Sivakumar, D., 2020. Extension of Avocado Fruit Postharvest Quality Using Non-Chemical Treatments. Agronomy, 10(2). https://doi.org/10.3390/agronomy10020212

Ozdemir, F., & Topuz, A., 2004. Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. Food Chemistry, 86(1), 79–83.

Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin- Nature's most versatile biological signal. FEBS Journal, 273 (13), 2813-2838.

Paniagua, C., Posé, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A., 2014. Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. Annals of Botany. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/aob/mcu149

Pesis, E., Dvir, O., Feygenberg, O., Arie, R.B., Ackerman, M., Lichter, A., 2002. Production of acetaldehyde and ethanol during maturation and modified atmosphere storage of litchi fruit. Postharvest Biol. Technol. 26, 157–165.

Pompa, S.S., Molina, R.R., Carbo, A.F.A., Galindo A.S., Garza, H.L., Cantu, D.J., Aguilar C.N., 2009. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. Food Res. Int., 42 pp. 511-515.

Salazar-López, N. J., Domínguez-Avila, J. A., Yahia, E. M., Belmonte-Herrera, B. H., Wall-Medrano, A., Montalvo-González, E., & González-Aguilar, G. A., 2020. Avocado fruit and by-products as potential sources of bioactive compounds. Food Research International, 138, 109774.

Selvarajah, S., Bauchot, A.D., John, P., 2001. Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. Postharvest Biol. Technol. 23, 167–170.

Serrano, M., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J. M., & Valero, D., 2009. Maturity Stage at Harvest Determines the Fruit Quality and Antioxidant Potential after Storage of Sweet Cherry Cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(8), 3240–3246.

Setagane, L., Mafeo, T. P., Mathaba, N., & Shikwambana, K., 2021. Mitigation of chilling injury with hot water treatment to improve early-season 'hass' avocado (Persea americana) fruit peel colour. Research on Crops, 22(1), 60–67. https://doi.org/10.31830/2348-7542.2021.037

Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Zhang, H., Li, D., Shi, J., Li, R., Weeda, S., Zhao, B., Ren, S., Guo, Y.D., 2015. Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life Journal of Experimental Botany, 66, 657-668. https://doi.org/10.1093/jxb/eru332

Valero, D. y Serrano, M., 2010. Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality, CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA. http://dx.doi.org/10.1201/9781439802670

Wang, S.-Y., Shi, X.-C., Wang, R., Wang, H.-L., Liu, F., & Laborda, P., 2020. Melatonin in fruit production and postharvest preservation: A review. Food Chemistry, 320, 126642.

Woolf, A.B., Cox, K.A., White, A. and Ferguson, I.B., 2003. Low Temperature Conditioning Treatments Reduce External Chilling Injury of "Hass" Avocados. Postharvest Biology and Technology, 28, 113-122.

Zentmyer, G.A., 1984. Avocado diseases. Int. J. Pest Manage., 30 pp. 388-444.

Zhai, R., Liu, J.L., Liu, F.X., Zhao, Y.X., Liu, L.L., Fang, C., Wang, H.B., Li, X.Y., Wang, Z.G., Ma, F.W., Xu L.F., 2018. Melatonin limited ethylene production, softening and reduced physiology disorder in pear (*Pyrus communis* L.) fruit during senescence. Postharvest Biol. Technol., 139, 38-46.

Zhao, D., Wang, R., Meng, J., Li. Z., Wu, Y., Tao, J., 2017. Ameliorative effects of melatonin on dark-induced leaf senescence in gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis): Leaf morphology, anatomy, physiology and transcriptome. Scientific Reports. 7(1): 10423. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10799-9

Zhao, H., Ye, L., Wang, Y., Zhou, X., Yang, J., Wang, J., Cao, K., Zou, Z., 2016. Melatonin increases the chilling tolerance of chloroplast in cucumber seedlings by regulating photosynthetic electron flux and the ascorbate-glutathione cycle. Frontiers in Plant Science 7,1814. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01814

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Aprovechamiento de un subproducto de la industria de aceituna para el desarrollo de alimentos con un valor añadido

M. Ródenas, M.J. Giménez, M.E. García-Pastor y P.J. Zapata

Dept. Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, e-mail: marina.rodenas@alu.umh.es

Resumen

La industria de aceituna que elabora productos encurtidos conlleva un problema ambiental de especial relevancia y de complicada solución tecnológica, económica y social como es la generación de salmueras residuales. Por otro lado, en los procesos de acondicionamiento posteriores a la elaboración de aceitunas de mesa, como pueden ser las operaciones de deshuesado y relleno de la aceituna, se generan unos residuos grasos que terminan siendo arrastrados en las aguas residuales de estas industrias. La particularidad de este trabajo se basa en la extracción de compuestos de alto valor añadido a partir de residuos resultantes del proceso de industrialización de aceitunas, cuyo contenido en ácidos grasos, compuestos fenólicos y sustancias de otra índole podrían hacerlos susceptibles de ser considerados como materia prima de interés para la elaboración o enriquecimiento de otros alimentos. Los resultados obtenidos determinaron que las características físico-químicas y funcionales del aceite y la salmuera, generados como subproductos en la industria de aceituna, los convertían en materias primas potenciales de alto valor tecnológico. Por ello, se desarrollaron, en primer lugar, nuevas formulaciones del relleno de las aceitunas (sabor anchoa, pimiento y limón) utilizando el aceite residual como subproducto que mostraron una mayor aceptabilidad global por parte del panel descriptivo, así como una mayor viscosidad frente a los rellenos comerciales elaborados con alginato de sodio. Por último, se abordó desarrollar concentrados salinos al 5 y 10 % durante distintos tiempos de inmersión (1, 2 y 3 horas) para elaborar boquerones en vinagre. Finalmente, los resultados obtenidos nos permitirán convertir un subproducto en coproducto, resolviendo parcialmente un problema medioambiental, y otorgando un valor añadido a nuestro producto final.

Palabras clave: aceite residual, antioxidantes, boquerón, emulsión, salmuera

Use of an olive industry by-product for value-added food development

Abstract

The olive industry involves an environmental problem of special relevance and a complicated technological, economic and social solution, such as the generation of residual brines after the pickling process. On the other hand, in the conditioning processes after the production of table olives, such as the pitting and filling operations of the olives, fatty residues are generated that end up being washed away in the wastewater of these industries. The particularity of this work is based on the extraction of high added value compounds from residues resulting from the industrialization process of olives, whose content in fatty acids, phenolic compounds and other substances could make them susceptible to being considered as raw material of interest for the preparation or enrichment of other foods. The results obtained determined that the physico-chemical and functional characteristics of the oil and the brine, generated as by-products in the olive industry, turned them into potential raw materials of high technological value. For this reason, new formulations of the filling of olives (anchovy, pepper and lemon flavour) were developed, using residual oil as a by-product, which showed greater global acceptability by consumers, as well as a higher viscosity against commercial fillers made with sodium alginate. Finally, it was approached to develop saline concentrates at 5 and 10 % during different immersion times (1, 2 and 3 hours) to elaborate anchovies in vinegar. Finally, the results obtained will allow us to convert a by-product into a co-product, partially solving an environmental problem, and giving added value to our final product.

Keywords: residual oil, antioxidants, anchovy, emulsion, brine

Introducción

España es líder mundial en producción y exportación de aceituna de mesa. La producción española representa aproximadamente el 71 % de la producción de la Unión Europea (UE) y el 22 % de la mundial. En concreto, la producción media en la última década (desde 2004 hasta 2013) se ha incrementado en un 57 % respecto a la media de la década anterior (período de 1994 al 2003), pasando de 330.057 a 516.919 t (MAPA, 2021). Aproximadamente, un 97 % de la producción mundial de aceituna de mesa proviene de la cuenca del Mediterráneo (Esteve et al., 2015). En la cosecha de 2019-2020, la producción mundial de aceituna de mesa ha mostrado un incremento del 13,9 %, con un total aproximado de 2,9 millones de t, con respecto a la campaña anterior. Por tanto, España continúa siendo actualmente el principal productor de este alimento, seguida muy de cerca por Egipto.

La industria de encurtidos presenta un problema ambiental de especial relevancia y de complicada solución tecnológica, económica y social, como es la generación de salmueras residuales. Por otro lado, en las operaciones de deshuesado y relleno de la aceituna, se generan unos residuos grasos que terminan siendo arrastrados en las aguas residuales de estas industrias. A pesar de los avances en los sistemas de producción de las aceitunas de mesa deshuesadas y rellenas, todavía se genera un gran volumen de residuos durante su procesamiento. Los principales efluentes que se generan en esta industria son grandes volúmenes de aguas residuales, caracterizadas por un alto contenido en materia orgánica poco biodegradable, elevado porcentaje de sólidos en suspensión y grasas, pH ácido o alcalino, elevada conductividad por su alto contenido en sal y aguas coloreadas por los polifenoles que forman parte de la composición de las aceitunas (Estrada-Cabezas, 2011). Estos compuestos hacen difícil el tratamiento de los residuos generados, ya que el manejo de estos supone, en la mayoría de los casos, pérdidas económicas para los productores (Esteve et al., 2015). Por tanto, la recuperación y búsqueda de nuevas oportunidades de aplicación de estos residuos, es uno de los grandes retos a los que se enfrenta hoy en día la innovación y el desarrollo en la industria agroalimentaria de la aceituna. Dado la problemática generada con la obtención de este tipo de subproductos, se han realizado distintas investigaciones recientes acerca de su aprovechamiento en la industria agroalimentaria de la aceituna (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de investigación publicados acerca del aprovechamiento de subproductos generados en la industria agroalimentaria de la aceituna.

Propuesta de valor para el aprovechamiento de subproductos	Referencia bibliográfica
Aplicaciones agrícolas y fuente de sustancias bioactivas.	García-Serrano et al. (2019)
Ingrediente alimentario funcional.	Jurmanović et al. (2019)
Utilización como fuente de biomasa.	Mediavilla et al. (2020)

En este sentido, existe un trabajo de investigación reciente cuyo objetivo principal fue la puesta en valor del aceite residual obtenido como subproducto de la industria de aceituna, utilizándolo como ingrediente principal para el desarrollo de un nuevo relleno con pasta de anchoa, ácido cítrico y pectina, sustituyendo el alginato de sodio que utiliza la industria actual (Pagán et al., 2020). En dicho estudio, los consumidores mostraron una mayor preferencia e intención de compra por el nuevo relleno elaborado con el subproducto de aceite. Sin embargo, se puso de manifiesto como necesidad de investigación futura estudiar la búsqueda de otro gelificante y/o estabilizante presente en la formulación del relleno, diferente a la pectina, el cual otorgase un comportamiento estable del relleno durante la etapa térmica de pasteurización, así como un incremento del sabor a anchoa. Por tanto, el objetivo principal del presente trabajo de investigación es la caracterización, reutilización y/o valorización de dos subproductos generados en la industria de aceituna; aceite (residuo graso) y salmuera (residuo acuoso), para la investigación, desarrollo e innovación (I+D+i) de productos alimentarios con un valor añadido: nuevas formulaciones utilizando el aceite residual para la elaboración de rellenos de aceitunas (anchoa, pimiento y limón) y concentrados salinos a partir del subproducto de la salmuera con los que se desarrollarán boquerones en vinagre.

Material y Métodos

Materiales

Para la elaboración de los productos, se utilizó la fracción grasa o aceite y la fracción acuosa o salmuera residual, dependiendo del producto a elaborar, obtenidas por una industria productora de aceitunas. Ambos subproductos provenían de la línea de deshuesado y relleno de la aceituna variedad 'Hojiblanca'. En dicha línea de procesado, se generaba un vertido (mezcla de salmuera y aceite) que tras un proceso de centrifugado a través de una centrífuga de molino se separaba en fase acuosa (salmuera) y fase grasa (aceite), obteniendo los dos subproductos mencionados, con un rendimiento aproximado del 80 %. Los alimentos desarrollados a partir de dichos subproductos son los siguientes:

1. La elaboración de nuevas formulaciones de rellenos o patés de relleno de aceitunas utilizando la fracción grasa o aceite obtenido como subproducto. Dichas emulsiones se elaboraron sustituyendo el alginato de sodio que utiliza la empresa como formulación control por el aceite obtenido como subproducto y que actúa como emulsionante de la emulsión o paté de relleno. Las formulaciones desarrolladas en el presente trabajo de investigación, se elaboraron utilizando pastas de anchoa, pimiento y limón. Los % de pastas formulados en la emulsión control y la elaborada a partir del subproducto fueron fijados por la empresa en un rango inferior al 50 %. Otros aditivos alimentarios utilizados, como el ácido cítrico, la gelatina, el alginato de sodio o la goma guar, fueron proporcionados por Prosur S.L. (Murcia, España). Las diferentes formulaciones elaboradas se realizaron con agua destilada. Todas las pruebas experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio a temperatura ambiente (25 ± 1 ºC). Las formulaciones de los nuevos rellenos desarrollados bajo el proceso de I+D+i se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Formulaciones de los rellenos o patés de relleno (control y elaborados con el subproducto de aceite) de las aceitunas rellenas de anchoa, pimiento y limón.

Ingrediente	Rellenos de pasta de anchoa control	Rellenos de pasta de anchoa con el subproducto	Rellenos de pasta de pimiento control	Rellenos de pasta de pimiento con el subproducto	Rellenos de pasta de limón control	Rellenos de pasta de limón con el subproducto
Agua	88,00 %	12,00 %	84,90 %	-	88,10 %	-
Aceite	-	63,33 %	-	63,33 %	-	63,00 %
Pasta de anchoa	9,00 %	13,00 %	-	-	-	-
Pasta de pimiento	-	-	12,10 %	31,00 %	-	-
Pasta de limón	-	-	-	-	8,80 %	33,00 %
Alginato de sodio	3,00 %	-	2,80 %	-	2,90 %	-
Gelatina	-	3,33 %	-	4,00 %	-	3,80 %
Goma guar	-	-	0,20 %	-	0,20 %	0,20 %
Ácido cítrico	-	8,33 %	-	2,00 %	-	-

2. El desarrollo de boquerones en vinagre a partir de concentrados salinos elaborados con el subproducto de salmuera. La elaboración del boquerón en vinagre con la inclusión de la salmuera como coproducto se llevó a cabo realizando distintas formulaciones: al 5 y 10 % de concentración salina durante distintos tiempos de inmersión (1, 2 y 3 horas) en dicha solución (salmuera + vinagre o ácido acético al 2 %).

Determinaciones analíticas

En primer lugar, para la caracterización funcional del subproducto de aceite, se identificó y cuantificó (g L^{-1}) el perfil de ácidos grasos (FAME) utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A acoplado a un detector de espectrometría de masas (GCMS-QP5050A), según las condiciones de análisis establecidas para aceitunas de mesa por Cano-Lamadrid et al. (2015). Por otro lado, se llevó a cabo una caracterización físico-química del subproducto de salmuera, donde se analizó el pH, la conductividad eléctrica (mS cm^{-1}) y la actividad de agua o a_w. Los protocolos de medición utilizados para dichos parámetros se indican en Valverde Veracruz (2005). Además, distintas determinaciones microbiológicas se llevaron a cabo en el del subproducto de salmuera para asegurar su inocuidad alimentaria: recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, enterobacterias, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes*. El recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras se realizó utilizando placas Petrifilm (3M) y medio VRBD Agar, respectivamente, y se expresó en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de producto (UFC g^{-1}). Sin embargo, el resto de recuentos se basaban en ausencia o presencia y/o en un recuento positivo (+) o negativo (-). El test Hygicult E/β-GUR (AIDIAN) se utilizó para la detección de enterobacterias y especies productoras de *β*-glucuronidasa y, entre ellas, *E. coli*. Los análisis de las especies de *Salmonella* se realizaron por parte de un laboratorio externo. Finalmente, el recuento de las especies de *Listeria* y, en concreto, *Listeria monocytogenes* se llevó a cabo a través del test por cambio de color utilizando InSite™ L. mono Glo (certificados por la *AOAC (Association of Analytical Communities) International*).

Por otro lado, la viscosidad de las emulsiones o rellenos de aceitunas se analizó a través del reómetro o viscosímetro rotacional digital VISCO STAR H (J.P. SELECTA) tras someter las muestras a 100 r.p.m con un husillo rotatorio modelo R5. En el caso de los boquerones en vinagre, la firmeza se determinó mediante el análisis de perfil de textura (TPA), también conocido como test de compresión doble, que se realizó según el protocolo descrito por Kaewudom et al. (2013), con ligeras modificaciones. La velocidad de prueba se fijó en 0,3 mm s^{-1} y la fuerza de deformación fue del 15 %. Cada muestra se repitió dos veces a 25 °C. Respecto al contenido de fenoles totales se cuantificó a través del método de Folin-Ciocalteu (Wood et al., 2002). Finalmente, se realizó un análisis sensorial descriptivo de todos los productos desarrollados con un panel capacitado de 10 jueces (de 25 a 55 años; 50 % hombres y 50 % mujeres), con más de 1000 horas de experiencia en análisis sensorial de alimentos del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Orihuela, Alicante, España). Los panelistas utilizaron una escala numérica para la intensidad de cada atributo correspondiente: 0 (sin intensidad) a 10 (extremadamente fuerte), con cambios de 0,5 unidades. En el caso de atributos relacionados con el término de homogeneidad, un valor de 5,00 sería un atributo homogéneo en el producto estudiado, de acuerdo con el procedimiento descrito por Sánchez-Rodríguez et al. (2019) en aceituna de mesa. Las aceitunas control eran las elaboradas por la empresa comercial con el gelificante de alginato de sodio mientras que los boquerones control eran productos comerciales del mercado. A todos ellos, se les atribuyeron valores de 5,00 en todos los atributos evaluados.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en 5 repeticiones para todas las determinaciones analíticas. Los resultados se expresaron como la media ± ES. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Las comparaciones de medias se realizaron utilizando la prueba *t* de Student para dos subconjuntos de datos y la prueba de Tukey cuando se trataba de un mayor número de muestras, con el fin de determinar si las diferencias entre muestras eran significativas a $p < 0,05$ en ambas pruebas. Las diferencias significativas han sido indicadas a través del uso de letras minúsculas (comparativa entre el producto fresco y el elaborado con el subproducto para cada tipo de producto desarrollado) y/o mayúsculas (comparativa del subproducto con los productos elaborados con el mismo). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software SPSS v.17.0 para Windows.

Resultados y Discusión

Caracterización del perfil lipídico del aceite obtenido como subproducto

De los resultados obtenidos de la caracterización del perfil lipídico del aceite como subproducto, se obtuvo un total de 21 ácidos grasos los cuales fueron identificados y cuantificados (Tabla 3). Sin embargo, los mayoritarios a resaltar fueron los siguientes: C18:1c9 (Ácido oleico), C16:0 (Ácido palmítico), C18:1c15 (-), C18:0 (Ácido esteárico), C18:3n3 (Ácido linolénico), C16:1c9 (Ácido palmitoleico) y C20:0 (Ácido araquídico), ordenados de mayor a menor proporción respecto a la composición del aceite. Dicho perfil de ácidos grasos provenientes del aceite de oliva que se encontraba en suspensión en la salmuera y fue sometido a un proceso de centrifugación para su extracción y/o separación, también se ha observado por otros autores en la variedad 'Hojiblanca' utilizada en el presente estudio (Ruiz-Domínguez, 2016). El ácido oleico (C18:1c9) se encontró presente en el subproducto de aceite en una proporción superior al 64 % del total de ácidos grasos. En concreto, del ácido oleico se declara como grasa insaturada que contribuiría en la dieta a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo (Reglamento (UE) Nº 432/2012).

Tabla 3. Caracterización del perfil lipídico del aceite obtenido de la salmuera.

Identificación Ácidos Grasos	Cuantificación (g L^{-1})	Nombre Común
C14:0	0,15 ± 0,01	Ácido mirístico
C15:0	0,14 ± 0,01	Ácido pentadecanoico
C16:0	67,65 ± 3,12	Ácido palmítico
C16:1c7	1,70 ± 0,09	Ácido palmitoleico
C16:1c9	8,18 ± 0,40	Ácido palmitoleico
C16:1c10	0,26 ± 0,02	Ácido cis-heptadecenoico
C17:0	2,33 ± 0,12	Ácido margárico
C17:1	4,33 ± 0,17	Ácido margaroleico
C18:0	30,52 ± 1,38	Ácido esteárico
C18:1t9	0,20 ± 0,01	Ácido elaídico
C18:1c9	403,06 ± 15,75	Ácido oleico
C18:1n7	37,90 ± 1,38	Ácido cis-vaccénico
C19:0	0,33 ± 0,01	Ácido nodecanoico
C18:1c15	51,34 ± 1,79	-
C20:0	6,46 ± 0,27	Ácido araquídico
C20:1c11	0,16 ± 0,01	Ácido gadoleico
C18:3n3	15,55 ± 0,70	Ácido linolénico
C21:0	0,27 ± 0,01	Ácido heneicosílico
C20:2	0,05 ± 0,00	Ácido cis-11,14 eicosadienoico
C22:0	1,75 ± 0,05	Ácido behénico
C24:0	1,31 ± 0,20	Ácido lignocérico

Caracterización físico-química, funcional y microbiológica de la salmuera obtenida como subproducto

En la Tabla 4, se muestra la determinación de los parámetros físico-químicos (pH, conductividad eléctrica y actividad de agua o a_w) de la salmuera obtenida como subproducto. Dicha salmuera mostró un valor de pH de 4,08, muy similar al valor obtenido en otros estudios realizados con salmueras procedentes del procesado de aceitunas que mostraron valores de pH próximos a 4 (Pastor-Alcañiz et al., 2014). Respecto al valor de conductividad eléctrica, este fue de 14,405 mS cm^{-1} haciendo ver que dicha salmuera analizada es una solución concentrada en sal. Si relacionásemos la conductividad eléctrica de la solución con la salinidad, dicho valor nos indicaría que la salmuera obtenida como subproducto presentaba un contenido en sal del 1,8 % (180 gramos de NaCl disueltos en 820 mL de H_2O). Finalmente, en la a_w medida obtuvimos un valor medio de 0,803.

Además, desde un punto de vista funcional, se cuantificó el contenido de fenoles totales de dicha salmuera (Tabla 4), observando que no existía ninguna diferencia significativa ($p \geq 0,05$) respecto a dicho contenido tras someterla a un tratamiento térmico de pasteurización (80 °C, 20 minutos), por lo

que dichos compuestos mostraban cierta estabilidad térmica. En un trabajo de investigación previo, se observó que, durante la cinética de descomposición térmica, la molécula o principio activo hidroxitirosol-OLPD presente en aceite de oliva con capacidad antiinflamatoria mostró que para temperaturas inferiores a 100 °C conservaba la integridad y estabilidad. Sin embargo, cuando fue sometido a condiciones de entre 170 y 220 °C durante 150 min se descomponía (Attya et al., 2010).

Tabla 4. Caracterización físico-química y funcional de la salmuera.

pH	Conductividad (mS cm^{-1})	a_w	Fenoles Totales (mg 100 g^{-1}) Sin autoclavar	Fenoles Totales (mg 100 g^{-1}) Autoclavada
4,080 ± 0,007	14,405 ± 0,024	0,803 ± 0,015	16,557 ± 0,098a	16,393 ± 0,068a

Además, desde un punto de vista funcional, se cuantificó el contenido de fenoles totales de dicha salmuera (Tabla 4), observando que no existía ninguna diferencia significativa ($p \geq 0,05$) respecto a dicho contenido tras someterla a un tratamiento térmico de pasteurización (80 °C, 20 minutos), por lo que dichos compuestos mostraban cierta estabilidad térmica. En un trabajo de investigación previo, se observó que, durante la cinética de descomposición térmica, la molécula o principio activo hidroxitirosol-OLPD presente en aceite de oliva con capacidad antiinflamatoria mostró que para temperaturas inferiores a 100 °C conservaba la integridad y estabilidad. Sin embargo, cuando fue sometido a condiciones de entre 170 y 220 °C durante 150 min se descomponía (Attya et al., 2010).

Tabla 5. Caracterización microbiológica de la salmuera.

Aerobios Mesófilos†	Mohos y Levaduras♦	Enterobacterias‡	*E. coli*‡	*Salmonella* spp.□	*Listeria* spp.¥	*Listeria monocytogenes*¥
$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	Ausencia	Ausencia	Ausencia	+	-

†Recuento (UFC g^{-1}) de la incubación a 30 °C realizado a las 48 horas. ♦Recuento (UFC g^{-1}) de la incubación a 25 °C realizado a las 72 horas. ‡Recuento (ausencia o presencia) de la incubación a 37 °C realizado a las 24 horas. □Recuento (ausencia o presencia) realizada por un laboratorio externo. ¥Recuento (positivo o negativo) de la incubación a 37 °C realizado a las 24 horas.

Por otro lado, se completó una caracterización microbiológica de la salmuera obtenida como subproducto (Tabla 5). En cuanto al recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras, podemos observar que se encontraba dentro de un rango aceptable o considerado como una solución con una carga microbiana baja y apta, principalmente determinada por microorganismos facultativos y estratos anaeróbicos originalmente presentes en el vegetal fresco, para su utilización como coproducto. Para el recuento de enterobacterias, *E. Coli* y *Salmonella spp.* se observó ausencia de dichos microorganismos en el subproducto de salmuera (Tabla 5). En contraposición, cuando se analizaron las especies de *Listeria* el recuento fue positivo (Tabla 5). Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente y era muy probable que al ser un subproducto derivado de la línea de procesado de las aceitunas rellenas se encontrasen presentes en él. Sin embargo, entre las diferentes especies incluidas en el género, *Listeria monocytogenes* es la única implicada en patología humana y el resultado del recuento de dicha cepa tóxica fue negativo.

Análisis físico-químico, funcional y sensorial de las emulsiones o rellenos de aceituna

En la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos acerca de la viscosidad y el contenido en fenoles totales de los rellenos elaborados con el subproducto de aceite y controles. Como podemos observar, el aceite obtenido como subproducto presentó una viscosidad (en centipoise) muy baja debido, principalmente, a que se presenta en estado líquido y no genera una elevada fuerza de fricción frente al husillo. Todas las emulsiones realizadas con el subproducto de aceite mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) frente a las emulsiones control. Este efecto fue debido a que el aceite utilizado como emulsionante consiguió una emulsión de aceite en agua (O/W) de mayor grado de viscosidad. En concreto, la emulsión estudiada que mostró mayor viscosidad frente a la formulación control fue la elaborada con pasta de anchoa.

El contenido en fenoles totales de los rellenos elaborados con el subproducto de aceite emulsionado con la pasta de anchoa, pimiento y limón, otros ingredientes (Tabla 2), fue significativamente ($p < 0,05$) mayor al contenido presente en la salmuera y al presentado por los controles. Estas diferencias respecto al contenido fenólico entre las formulaciones control y las nuevas desarrolladas podrían venir determinadas por la influencia del contenido de fenoles totales del subproducto de aceite de oliva empleado para realizar las emulsiones. En este sentido, se ha corroborado que el aceite de oliva presenta un elevado contenido fenólico (Sánchez-Rodríguez et al., 2020), el cual es aportado a la emulsión desarrollada y, combinado con el contenido fenólico aportado por cada una de las pastas (anchoa, pimiento y limón) que la conforman, le otorgan al producto final un valor añadido. Entre las emulsiones con el mayor contenido fenólico, se encuentran las desarrolladas a partir de las pastas de pimiento y limón.

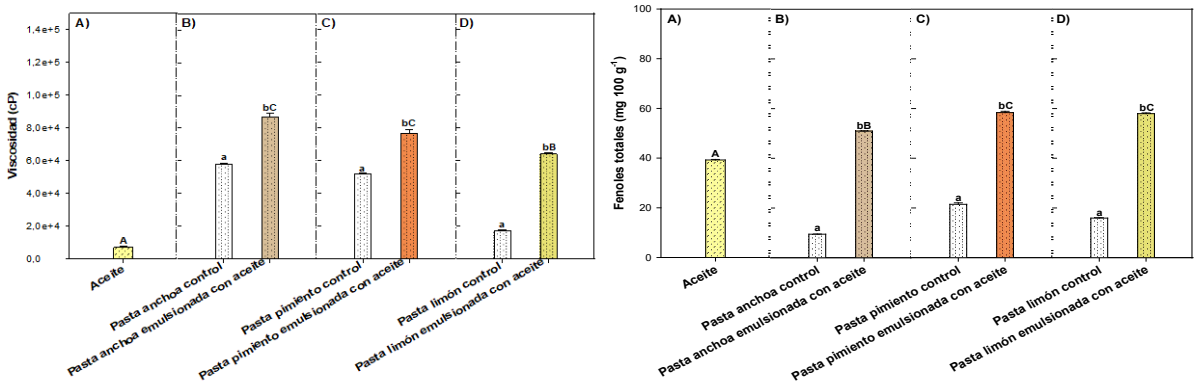


Figura 1. Viscosidad (cP) y contenido de fenoles totales (mg 100 g^{-1}) de los rellenos elaborados con el subproducto de aceite (A): relleno de anchoa (B), relleno de pimiento (C) y relleno de limón (D).

En la Tabla 6, se muestra un análisis descriptivo de las aceitunas rellenas con el nuevo relleno frente a las aceitunas control. Como podemos ver, las aceitunas rellenas de anchoa presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los atributos de olor a anchoa, untuosidad en boca, sabor a anchoa, salado, postgusto de la aceituna y satisfacción global, siendo estos valorados positivamente frente al control. Sin embargo, el atributo de color a anchoa de la nueva emulsión elaborado con el subproducto de aceite mostró una puntuación significativamente ($p < 0,05$) inferior a la emulsión control. Dicho atributo podría verse influido por la adicción de aceite en la formulación o al alcanzar la desnaturalización proteica tras llegar al punto isoeléctrico de las proteínas de la anchoa al adicionar ácido cítrico en la nueva formulación (Tabla 2).

Tabla 6. Estudio estadístico del análisis sensorial descriptivo de las aceitunas rellenas elaboradas con el relleno desarrollado a través del subproducto de aceite: pasta de anchoa, pasta de pimiento y pasta de limón. La escala de valoración oscila entre 1-10.

Atributo	ANOVA†	Control	Anchoa	ANOVA†	Control	Pimiento	ANOVA†	Control	Limón
Color anchoa/pimiento/limón del relleno	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07
Olor anchoa/pimiento/limón	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,11
Olor aceituna	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,07	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,07	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,07
Untuosidad en boca	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	8,00 ± 0,07
Sabor anchoa/pimiento/limón	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	8,00 ± 0,07
Sabor aceituna	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,16	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,16	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,16
Salado	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,07	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,14	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,14
Acidez	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,07	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07
Postgusto aceituna	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07
Satisfacción global	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	8,00 ± 0,14

† NS, no significativo ($p \geq 0,05$). *, ** y ***, dentro del mismo tipo de aceituna rellena, denotan diferencias significativas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

De igual forma, la adición de aceite como emulsionante a los nuevos rellenos mejoró las propiedades sensoriales de las otras dos emulsiones elaboradas con pasta de pimiento y pasta de limón (Tabla 6). Los resultados mostraron también diferencias significativas ($p < 0,05$) para ambas formulaciones con respecto a los controles en cuanto al olor a pimiento/limón, untuosidad en boca, sabor a pimiento/limón, acidez (en el caso del limón), postgusto de la aceituna y satisfacción global. Respecto al color, también

presentaron ambas formulaciones diferencias significativas ($p < 0,05$). La emulsión de pimiento mostró la misma problemática respecto al color que la pasta de anchoa ya que dicha emulsión diluyó la tonalidad rojiza característica del pimiento rojo, perdiéndose. En cambio, la nueva emulsión de limón desarrollada mostró una mejora en el color puesto que el tono amarillo de dicha emulsión se incrementó y a los jueces entrenados les parecía que era más natural.

Análisis físico-químico, funcional y sensorial de los productos de boquerones en vinagre

Cuando se llevó a cabo el test de análisis de perfil de textura 'TPA' de los boquerones en vinagre (Figura 2), el parámetro de dureza fue incrementado significativamente ($p < 0,05$) conforme se incrementaba el % en sal de la salmuera y el tiempo de inmersión. En contraposición, la cohesividad y elasticidad de los productos mostraron valores reducidos en los boquerones inmersos en la salmuera durante más tiempo (2 y 3 horas) para ambas concentraciones de salmuera ensayadas. Finalmente, la adhesividad fue también significativamente mayor ($p < 0,05$) en los boquerones que presentaban menores valores de dureza. En un estudio de conservación de pescado fresco de crianza, donde se estudió la evolución de los parámetros de calidad del mismo, se observó que los valores de olor a ácido, olor a rancio, olor a pútrido y adhesividad del pescado incrementaron conforme avanzaba el tiempo de almacenamiento en los distintos envases (JACUMAR, 2021).

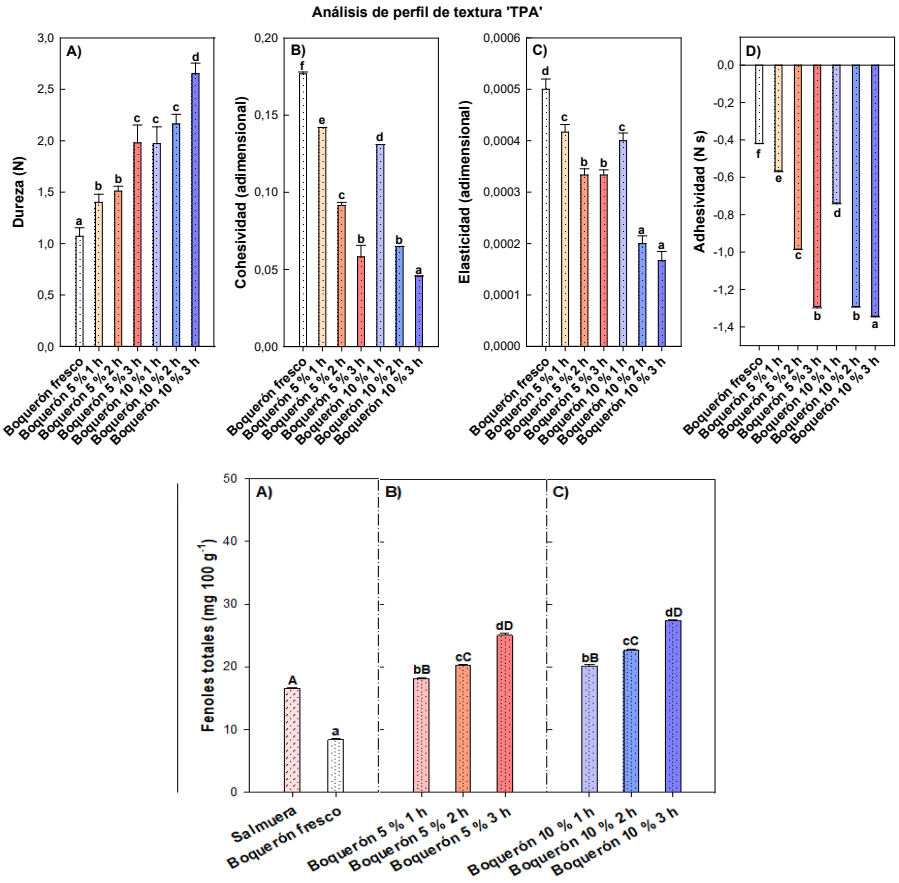


Figura 2. Firmeza (análisis de perfil de textura 'TPA') del producto de boquerón en vinagre elaborado con la salmuera concentrada al 5 % y 10 % en sal durante distintos tiempos de inmersión (1, 2 y 3 horas). Parámetros primarios del TPA: dureza (A), cohesividad (B), elasticidad (C) y adhesividad (D). Contenido de fenoles totales del producto de boquerón en vinagre elaborado con la salmuera (A) concentrada al 5 % (B) y 10 % (C) en sal durante distintos tiempos de inmersión (1, 2 y 3 horas).

En la Figura 2, también se muestra el contenido de fenoles totales presentes en el producto de boquerón en vinagre elaborado con la salmuera obtenida como subproducto. Como se puede observar, se dieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el boquerón en fresco y los diferentes ensayos realizados. Nuevamente, estos resultados nos muestran que el contenido fenólico proveniente del coproducto de

salmuera es transferido al boquerón al hacer la inmersión de este. En el gráfico también se observa como a mayor tiempo de inmersión del pescado en el líquido de gobierno (salmuera + vinagre o ácido acético), mayor contenido fenólico presentará el producto final elaborado. En conclusión, el que mejor resultado respecto al contenido fenólico total nos es aportado por el producto de boquerón inmerso en salmuera al 5 o 10 % en sal, sin importar dicha concentración, durante 3 horas.

Sin embargo, desde el punto de vista sensorial, como se puede observar en la Tabla 7, el panel entrenado catalogó el producto elaborado con la salmuera del 10 % como la prueba más salada en boca y presentando una arista sensorial en este sentido. Por ello, la mejor prueba combinando los resultados funcionales y sensoriales, es la del boquerón en vinagre elaborado por inmersión en un líquido de gobierno compuesto por una salmuera del 5 % en contenido en sal durante 3 horas. Además, desde el punto de vista saludable, es preferible la utilización de una salmuera con un menor contenido en sal, el cual va a ser transferible al producto.

Tabla 7. Estudio estadístico del análisis sensorial descriptivo del producto de boquerón en vinagre elaborado con la salmuera concentrada al 5 y 10 % en sal durante distintos tiempos de inmersión (1, 2 y 3 horas) frente a un control (producto comercial). La escala de valoración oscila entre 1-10.

Atributo	ANOVA†	Control	5 % 1 hora	ANOVA†	Control	5 % 2 horas	ANOVA†	Control	5 % 3 horas
Homogeneidad del color	***	5,00 ± 0,00	2,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	3,00 ± 0,07	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,07
Dureza	***	5,00 ± 0,00	2,00 ± 0,09	***	5,00 ± 0,00	3,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,07
Salado	***	5,00 ± 0,00	3,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,11
Sabor a boquerón en vinagre	***	5,00 ± 0,00	2,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	3,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,11
Acidez	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,11
Postgusto	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07
Satisfacción global	***	5,00 ± 0,00	3,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07
Atributo	**ANOVA†**	**Control**	**10 % 1 hora**	**ANOVA†**	**Control**	**10 % 2 horas**	**ANOVA†**	**Control**	**10 % 3 horas**
Homogeneidad del color	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,07	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,11
Dureza	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07
Salado	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	7,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	8,00 ± 0,11
Sabor a boquerón en vinagre	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	3,00 ± 0,07
Acidez	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,07
Postgusto	***	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	3,00 ± 0,11
Satisfacción global	NS	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,07	***	5,00 ± 0,00	4,00 ± 0,11	***	5,00 ± 0,00	3,00 ± 0,11

† NS, no significativo ($p \geq 0,05$). *, ** y ***, dentro del mismo tipo de aceituna rellena, denotan diferencias significativas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

Conclusiones

En conclusión, las características funcionales del aceite y físico-químicas y/o microbiológicas de las salmueras generadas como subproductos de la industria de la aceituna muestran una elevada capacidad tecnológica y funcional para su reutilización como coproductos. Además, el desarrollo de nuevas formulaciones para la elaboración de rellenos o patés de las aceitunas rellenas de anchoa, pimiento y limón, utilizando el aceite residual como subproducto, mostró ser una estrategia potencial para elaborar alimentos con un valor añadido y más funcionales, reduciendo de forma parcial un problema de alto impacto medioambiental. Finalmente, el desarrollo de concentrados salinos a partir del subproducto de la salmuera, aportaron al boquerón en vinagre un valor añadido por su contenido en compuestos fenólicos y por la conversión de un subproducto en coproducto en línea con el concepto de economía circular.

Agradecimientos

Al Grupo de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Universidad Miguel Hernández por el asesoramiento prestado para la realización del análisis sensorial.

Bibliografía

Attya, M., Benabdelkamel, H., Perri, E., Russo, A., Sindona, G., 2010. Effects of conventional heating on the stability of major olive oil phenolic compounds by tandem mass spectrometry and isotope dilution assay. Molecules 15(12), 8734-46. https://doi.org/10.3390/molecules15128734.

Cano-Lamadrid, M., Girón, I.F., Pleite, R., Burló, F., Corell, M., Moriana, A., Carbonell-Barrachina, A., 2015. Quality attributes of table olives as affected by regulated deficit irrigation. LWT 62, 19-26. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.063.

Esteve, C., Marina, M.L., García, M.C., 2015. Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. Food Chem. 167, 272-280. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.090.

Estrada-Cabezas, J.M., 2011. La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades. Arahal, Aceituna de Mesa Fundación para el Fomento y Promoción, Sevilla, España.

García-Serrano, P., Sánchez, A.H., Romero, C., García-García, P., de Castro, A., Brenes, M., 2019. Processing of table olives with KOH and characterization of the wastewaters as potential fertilizer. Sci. Total Environ. 676, 834-839. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.193.

JACUMAR, 2021. Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos. Caracterización de la Calidad del Pescado de Crianza. Informe Final de Planes Nacionales de Cultivos Marinos. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/planes_nacionales/Documentos/103_IF_CALIDAD.pdf.

Jurmanović, S., Jug, M., Safner, T., Radić, K., Domijan, A., Pedisić, S., Čepo, D.V., 2019. Utilization of olive pomace as a source of polyphenols: Optimization of microwave-assisted extraction and characterization of spray-dried extract. J. Food Nutr. Res. 58, 51-62.

Kaewudom, P., Benjakul, S., Kijroongrojana, K., 2013. Properties of surimi gel as influenced by fish gelatin and microbial transglutaminase. Food Bioscience 1, 39-47. http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2013.03.001.

MAPA, 2021. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España, 2021. Producciones agrícolas: aceite de oliva y aceituna de mesa. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/2014%2002%2027%20datos%20WEB%20olivar-final_tcm30-135522.pdf.

Mediavilla, I., Barro, R., Borjabad, E., Peña, D., Fernández, M.J., 2020. Quality of olive stone as a fuel: Influence of oil content on combustion process. Renew. Energy 160, 374-384. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.001.

Pagán, I., García-Pastor, M.E., Giménez, M.J., Zapata, P.J., 2020. Aprovechamiento de desechos generados en la industria de la aceituna rellena para la elaboración de nuevos productos alimenticios. I Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA).

Pastor-Alcañiz, L., Doñate-Hernández, S., Ferrer-Polonio, E., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., 2014. Alternativas para el tratamiento de salmueras procedentes del procesado de aceitunas: procesos químicos y biológicos. Tecnoaqua 10, 70-76.

REGLAMENTO (UE) Nº 432/2012 DE LA COMISIÓN de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.

Ruiz-Domínguez, L., 2016. Caracterización de la calidad fisicoquímicas y organolépticas de aceites de oliva virgen de variedades tradicionales de la comunidad valenciana. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: http://hdl.handle.net/10251/62690.

Sánchez-Rodríguez, L., Cano-Lamadrid, M., Carbonell-Barrachina, A.A., Sendra, E., Hernández, F., 2019. Volatile Composition, Sensory Profile and Consumer Acceptability of HydroSOStainable Table Olives. Foods 8(10), 470. http://dx.doi.org/10.3390/foods8100470.

Sánchez-Rodríguez, L., Kranjac, M., Marijanović, Z., Jerković, I., Pérez-López, D., Carbonell-Barrachina, A.A., Hernández, F., Sendra, E., 2020. "Arbequina" Olive Oil Composition Is Affected by the Application of Regulated Deficit Irrigation during Pit Hardening Stage. J. Am. Oil Chem. Soc. 97(5), 449-462. https://doi.org/10.1002/aocs.12332.

Valverde Veracruz, J.M., 2005. Nuevas tecnologías no contaminantes para preservar la calidad de la uva durante su conservación post-recolección. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.

Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., Peskin, A.V., 2002. Antioxidant activity proacyanidin-containing plant extracts at different pHs. Food Chem. 77, 155-161. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00329-6.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Mejora de la conservación de la granada "Mollar de Elche" mediante tratamientos precosecha con Jasmonato de Metilo

A.M. Codes-Alcaraz, A. Dobón-Suárez, M.E. García-Pastor, S. Castillo

Dept. Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, e-mail: anacodes97@gmail.com

Resumen

En este trabajo, se estudia el efecto de los tratamientos con jasmonato de metilo (JaMe) a la concentración de 5 mM mediante vía foliar en distintas parcelas de granados distribuidas dentro de la DOP "Granada Mollar de Elche". El objetivo fue analizar los frutos tratados y controles una vez sometidos a una conservación frigorífica (6-8 ºC) desde el momento de la recolección hasta mediados del mes de enero. Para ello, se ha analizado la resistencia de las granadas a los daños por frío y sus propiedades físico-químicas, observándose una mejora de su aspecto externo e interno con una reducción de los daños respeto a los frutos control. En conclusión, el tratamiento mejoró la calidad de la granada durante la conservación en postcosecha, lo que aumentaría considerablemente su aceptación por parte de los consumidores y sus posibilidades de exportación hacia mercados internacionales.

Palabras clave: almacenamiento, antioxidantes, calidad, daños por frío, elicitores.

Improvement of "Mollar de Elche" pomegranate storage through preharvest treatments with Methyl Jasmonate

Abstract

In this work, the effect of treatments with Methyl Jasmonate (MeJa) at 5 mM concentration by foliar spray is studied, in different plots of pomegranate trees distributed within the "Granada Mollar de Elche" PDO. The objective was analyse the treated and untreated fruits once they have been subjected to cold storage (6-8 ºC) from harvest time until the middle of january. Thus, pomegranate resistance to chilling injury and their physico-chemical properties have been analysed, reporting an improvement on their external and internal appearance with a chilling injury reduction compared to untreated fruits. In conclusion, the treatment improved the pomegranate fruit quality during postharvest storage, which would considerably increase its acceptance by consumers and its export possibilities to international markets.

Keywords: storage, antioxidants, quality, chilling injury, elicitors.

Introducción

La granada (*Punica granatum*, L.) pertenece a la familia de plantas *Punicaceae*. Es una fruta importante por sus propiedades nutricionales y funcionales. Por ello el cultivo del granado ha ido adquiriendo en los últimos años cada vez más importancia, debido a sus numerosos beneficios. De acuerdo con lo publicado por Kader (2006), tras la recolección de la granada se producen una serie de alteraciones en el fruto que determinan su pérdida de calidad en un período de tiempo relativamente corto durante su conservación. Entre dichas alteraciones destacan: deshidratación, daños por frío o "chilling injury" (CI) y podredumbres. La demanda de granada está aumentando recientemente debido a la elevada aceptación del consumidor por esta fruta, la cual es principalmente debida a su sabor especial y al alto contenido en compuestos bioactivos. Por lo tanto, descubrir métodos para un mejor almacenamiento durante más tiempo con un adecuado valor comercial es muy importante para desestacionalizar el consumo y mejorar el precio de venta. El método común para extender la vida de los alimentos es el empleo de temperaturas bajas o almacenamiento en frío, pero la granada muestra efectos o síntomas negativos, principalmente la aparición de manchas marrones en la corteza externa e interna, cuando es almacenada a dichas temperaturas tan bajas (< 5 ºC) (García-Pastor et al., 2020a).

La calidad de la granada va a depender en gran medida del tamaño del fruto, color de la corteza y ausencia de defectos visuales, como quemaduras solares "albardado", grietas de crecimiento, cortes, roces y magulladuras, así como del color de los arilos, el cual varía de una tonalidad rosácea a roja, del contenido en azúcares, ácidos y de la presencia de semillas pequeñas y blandas (Valero, 2010; Pareek et al., 2015). El jasmonato de metilo (JaMe) es una hormona vegetal endógena derivada del ácido jasmónico (AJ) que juega un papel importante en el desarrollo de la planta. Se ha observado que es un inductor de la resistencia sistémica adquirida y que también proporciona tolerancia a la planta contra diferentes tipos de estreses, así como interviene en la floración, germinación de plántulas y regulación del crecimiento vegetal y maduración de la fruta (Serrano et al., 2018). Por último, también se ha publicado su reciente papel en la reducción de la aparición del chilling injury (CI) en una amplia gama de frutos (Aghdam y Bodbodak, 2013; Glowacz y Ree, 2016). Dados los problemas existentes en la granada durante su conservación en cámaras de refrigeración, provocando en el fruto daños por frío que deterioran el aspecto del mismo, se han desencadenado numerosos estudios de diferentes grupos de investigación, donde se ha podido evaluar el efecto de elicitores en campo para la mejora de la calidad de esta fruta. Entre dichos estudios, se han realizado aplicaciones con JaMe en campo en diferentes momentos del desarrollo del fruto evaluando el efecto en cuanto a la producción y su calidad en el momento de la recolección y durante la conservación en cámara (cereza, ciruela, uva, granada) a 2 ºC y 10 ºC, así como en los daños por frío durante la conservación. En ellos, se concluyó que dichos tratamientos con JaMe reducen estos daños por frío e incrementan la calidad del fruto. El objetivo principal de este trabajo es: conocer los efectos del tratamiento en campo con JaMe 5 mM en los diferentes agrosistemas y el tipo de manejo del cultivo, estudiando los parámetros de calidad de la granada Mollar de Elche durante la conservación en cámaras frigoríficas, evaluando los distintos parámetros de calidad físico-químicos y fito-químicos, así como sobre la aparición de daños por frío durante dicha conservación en cámaras industriales.

Material y Métodos

En este trabajo se utilizaron granadas (*Punica granatum* L. cv. Mollar de Elche). Las granadas provenían de cuatro parcelas de granados de la DOP 'Granada Mollar de Elche'. En dichas parcelas, se realizaron los tratamientos con jasmonato de metilo por vía foliar 5 días antes de su recolección (Tabla 1). Tras la recolección, todos los frutos de cada parcela (entre 80 y 200 frutos) fueron transportados para su almacenamiento en cámaras industriales y 10 frutos por

tratamiento (10 control y 10 tratados) y parcela, para su análisis al laboratorio del Grupo de Post-Recolección de Frutas y Hortalizas de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (E.P.S.O.), perteneciente a la Universidad Miguel Hernández de Elche. El tratamiento aplicado en los granados 'Mollar de Elche' para cada una de las parcelas se realizó con una solución de jasmonato de metilo (JaMe) (pureza del 95 %, Sigma Aldrich, Madrid) a la concentración 5 mM emulsionado con mojante/Tween-20 (0,5 mL L^{-1}) para su posterior aplicación por vía foliar. Este tratamiento se le aplicó mediante pulverización foliar de 3 L $árbol^{-1}$ a 5 árboles por cada parcela seleccionada para el estudio. Las condiciones de almacenamiento de las dos cámaras, siendo las temperaturas medias y humedad relativa (HR) en la Cámara 1 (8,1 °C y 94,7 % HR) y en la Cámara 2 (6,1 °C y 95,1 % HR) (Figura 1). Dichas temperaturas y humedades relativas medias fueron superiores a 5 ºC y son las consideradas idóneas para el almacenamiento de granadas durante periodos largos (Gil et al, 1996).

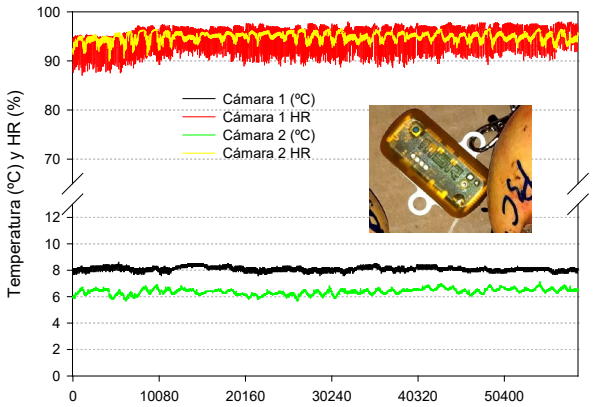


Figura 1. Evolución de temperaturas y HR en las cámaras durante los últimos 50 días de conservación con un sensor localizado dentro de cajas (datalogger MSR715).

Los tratamientos se realizaron en el momento en el que los productores iban a realizar la 2ª y última recolección, de acuerdo a criterios comerciales u otros (por compradores, estado madurez, etc). Para ello, se trataron las 4 parcelas entre 4 y 5 días antes de la recolección. Las fechas de los tratamientos, las recolecciones y muestreos de cada una de las parcelas se pueden apreciar en la Tabla 1. En ella, se puede ver como el primer tratamiento se realizó el día 1 de octubre y el último el día 15 de octubre, siendo las fechas de recolección adelantadas una semana antes que el año anterior 2019 (Dobón-Suárez et al., 2020)

Tabla 1. Calendario de cada una de las parcelas, tratamientos (T), recolección (R) y muestreos (M0, M1, M2, M3) de las granadas 'Mollar de Elche'.

	Octubre																				Noviembre						Enero
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	4-11		9-11		27-11		30-11		12-01-21
Parcela 1	T					R	M0															M1				M2				M3
Parcela 2								T					R	M0								M1				M2				M3
Parcela 3														T					R	M0				M1				M2	M3
Parcela 4															T					R	M0			M1				M2	M3

Parámetros físico-químicos

El color se determinó mediante un colorímetro triestímulo CR-400 Minolta, y usando el Sistema Cie Lab (L*, a* y b*), expresado en ºhue*. El color se determinó tanto en la superficie externa del fruto como en el interior una vez cortado sobre la zona ecuatorial (Martínez-Romero et al., 2002). Se realizó sobre 10 frutos control y 10 tratados (6 datos por fruto). Los resultados son la media ± ES. La firmeza del fruto se determinó usando un Texturómetro TAXTplus (Texture Analyzer, Stable Microsystems, Godalming, UK) La determinación de la firmeza se realizó aplicando una deformación en el fruto de un 5 % respecto a su diámetro ecuatorial. Los

resultados se expresaron como la relación existente entre la fuerza necesaria para conseguir la deformación y la distancia de dicha deformación ($N \cdot mm^{-1}$) (Valero et al., 2002). Los resultados son la media ± ES. Los sólidos solubles totales (SST) están relacionados con el estado de madurez y, por tanto, con el contenido en azúcares. Estos fueron medidos mediante refractometría. Para ello se utilizó un refractómetro digital HANNA HI96811 (0 - 50 % Brix), con una sensibilidad de ± 0,2 ºBrix a 20 °C, y se expresaron como °Brix (media ± ES). Este aparato se calibró con agua destilada y se realizaron dos mediciones por muestra. La acidez titulable se determinó por valoración mediante un valorador automático Metrohm (785 DMP Titrino, Metrohm) de sensibilidad ± 0,01. Se valoró con hidróxido sódico (NaOH) a 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,10 (AOAC, 1990). El análisis se realizó añadiendo 1 mL de zumo en 25 mL de agua destilada. Los resultados se expresaron en gramos del ácido málico por 100 mL de muestra. Las medidas se realizaron por duplicado en cada muestra, siendo los resultados la media ± ES. La determinación del pH se realizó con un pH-metro Crison MM 41 de sensibilidad ± 0,1.

Compuestos bioactivos

La extracción de fenoles fue realizada como se describe en Serrano et al. (2009a) con pequeñas modificaciones. En un tubo de centrífuga rodeado de hielo picado, se pipetearon 5 mL de zumo, los cuales se extrajeron con 10 mL de agua: metanol (20:80 v/v) conteniendo 0,0839 g de FNa (para inactivar la actividad del enzima polifenol oxidasa y prevenir la degradación fenólica). Se homogeneizó en un Polytron (IKA T18 basic, Ultra turrax) durante 1 minuto. Los extractos se centrifugaron a 10.000 rpm en una centrífuga DisplayCentrifuge 5804 R durante 10 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se guardó en tubos eppendorfs para su posterior cuantificación. Para la determinación del contenido en fenoles totales, las muestras se analizaron por duplicado en cada extracto, cuantificándose mediante el reactivo Folin-Ciocalteau, el cual reacciona con los compuestos fenólicos dando un color azul característico (Sayyari et al., 2011). En un tubo de ensayo, se añadieron 200 µL de extracto de muestra, 300 µL de tampón fosfato y 2,5 mL del reactivo Folin diluido 1/10. Se agitó y se dejó durante 3 minutos para que tuviese lugar la reacción. Posteriormente, se añadieron 2 mL de disolución 75 g L^{-1} de Na_2CO_3 para parar dicha reacción y se agitó nuevamente. Finalmente, se introdujeron los tubos en un baño a 50 °C durante 5 minutos y, tras ello, se procedió a la lectura mediante espectrofotometría a 760 nm en un espectrofotómetro UV1900 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER (Shimadzu). Previamente, se realizó una recta de calibrado patrón con ácido gálico. Los resultados fueron expresados como mg ácido gálico equivalentes (GAE) por 100 g y fueron la media de 3 réplicas ± ES.

Para la extracción de antocianos, se homogeneizaron 2,5 mL de zumo de granada, previamente centrifugado, en 10 mL de agua: metanol (20:80 v/v) conteniendo 0,0839 g de FNa (para inactivar la actividad de la polifenoloxidasa y prevenir la degradación fenólica) y un 1 % de HCL. Seguidamente, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Finalmente, mediante el uso de un espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu) se midió la absorbancia a 520 nm del sobrenadante (por duplicado para cada muestra) y el contenido total de antocianinas (TAC) se expresó como $mg \cdot 100\ g^{-1}$ de equivalentes de cianidina 3-*O*-glucósido (Cyn 3-gluc, con un coeficiente molar de absorción de 23,900 $L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$ y un molecular peso de 449,2 $g \cdot mol^{-1}$). La actividad antioxidante total (AAT) fue cuantificada de acuerdo con Serrano et al. (2009b), que permite determinar en la misma extracción la AAT debida tanto a los componentes hidrofílicos (AAT-H) como lipofílicos (AAT-L), y los resultados se expresaron como mg de Trolox equivalente (TE) en $mg \cdot 100\ g^{-1}$ y son la media de 3 réplicas ± ES.

Determinación de daños por frío

Para la evaluación de daños por frío o 'chilling injury' (CI) de las granadas una vez conservadas en las cámaras comerciales y mantenidas dos días a temperatura ambiente (20 ºC), se evaluó visual e individualmente cada fruto de acuerdo con una escala hedónica de 6 puntos basada en el

porcentaje de superficie de corteza afectada por los síntomas del CI (deshidratación, pardeamiento y punteado): siendo 0 (sin síntomas), 1 (1-20 %), 2 (21-40 %), 3 (41-60 %), 4 (61-80 %) y 5 (> 81 %). Estas escalas se realizaron según fotografías publicadas por Garcia-Pastor et al. (2020b) en granada 'Mollar de Elche', y con ellas se evaluó el grado de sintomatología de estos daños por frío tanto externamente como internamente Los resultados se expresaron como la media ± ES de 10 frutos. La permeabilidad de la membrana se determinó como la fuga de electrolitos según el método utilizado por Chen (2008), con ligeras modificaciones. En primer lugar, se cortó la piel de la granada en forma de pequeños discos de 0,5 cm de diámetro (3 lotes de 16 discos para los 10 frutos) y se lavaron tres veces con agua desionizada. Después de secarlos con papel de filtro, los discos se colocaron en botes de vidrio con 30 mL de agua desionizada. Los botes se agitaron suavemente en un agitador (Nahita, Model 685/2) a 25 °C durante 30 min y se determinó la conductividad eléctrica inicial (L_t) de la solución medida con un conductímetro (XS COND 51^+) (Figura 23). Los botes con las muestras se congelaron durante 24 horas y, posteriormente, se sometieron a un tratamiento térmico de 100 °C durante 10 min. Tras el enfriado de los botes a temperatura ambiente (≈ 25 ºC), se midió nuevamente la conductividad final de los electrolitos totales (L_0). La tasa de fuga de electrolitos se expresó como porcentaje del total: $(L_t/L_0) \times 100$, y los resultados fueron la media ± ES.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± ES de tres repeticiones. Los datos para las determinaciones físico-químicas y funcionales se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), realizado por el programa SPSS Statistics paquete de software v. 12.0 para Windows. Los parámetros como azucares, ácidos orgánicos individuales, daños por frío y fuga de electrolitos se sometieron a una comparación de medias utilizando la prueba *t* de Student para examinar si las diferencias eran significativas con un valor de $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

En el presente estudio sobre el tratamiento con JaMe en Granada 'Mollar de Elche' (Tabla 2) se han mostrado diferencias significativas respecto a las parcelas evaluadas, al tratamiento y a los muestreos que se han llevado a cabo, encontrándose también interacciones entre dichas variables.

Tabla 2. Análisis estadístico mediante la realización de un test ANOVA para los parámetros físico-químicos y funcionales evaluados con la representación del valor de Fisher (*F*) y el nivel de significancia para cada factor estudiado y sus interacciones.

Parámetro	Parcela	Tratamiento	Muestreo	Parcela x Tratamiento	Parcela x Muestreo	Tratamiento x Muestreo x Parcela	Tratamiento x Muestreo
Firmeza ($N \cdot mm^{-1}$)	30,97***	18,45***	106,92***	7,03***	2,16*	NS	NS
Color externo (h)	49,69***	4,39*	21,33***	7,29***	2,66**	12,11***	NS
Color interno (h)	48,77***	NS	17,93***	NS	6,87***	NS	NS
SST (°Brix)	64,19***	5,05*	11,75***	11,99***	4,68***	3,99**	1,93*
pH	33,36***	NS	20,22***	NS	5,52***	NS	NS
AT ($g \cdot 100\ g^{-1}$)	29,92***	NS	54,65***	NS	15,28***	NS	NS
Antocianinas totales ($mg \cdot 100\ g^{-1}$)	74,60***	NS	7,69***	NS	NS	NS	NS
Fenoles totales ($mg \cdot 100\ g^{-1}$)	13,02***	NS	14,76***	NS	5,88***	NS	NS
AAT-Hidrosoluble ($mg \cdot 100\ g^{-1}$)	24,12***	NS	73,01***	NS	NS	NS	NS
AAT-Liposoluble ($mg \cdot 100\ g^{-1}$)	15,76***	NS	107,27***	NS	6,18***	NS	NS

NS, no significativo ($p \geq 0,05$). Los símbolos *, ** y *** denotan diferencias significativas ($p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente).

Parámetros físico-químicos

Los sólidos solubles totales mostraron diferencias significativas entre parcelas, debido a los diferentes momentos de recolección (Tabla 1), donde se ve un aumento de sólidos solubles con el retraso de la recolección (7, 13 y 14 días) desde valores de 14,6 hasta valores finales de 16,8 ºBrix (Figura 2) Dentro de una misma parcela, se obtuvieron diferencias significativas entre las granadas tratadas y controles ($p < 0,05$), donde se observó un aumento de sólidos solubles en las granadas tratadas con JaMe. Efectos similares se obtuvieron en ensayos de granada tratadas con JaMe (Guillén et at., 2019; García-Pastor et al., 2020a). Finalmente, también se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,01$) en la interacción conjunta tratamiento*muestreo*parcela. Con respecto a la acidez total, para cada parcela tanto las granadas control como aquellas tratadas con JaMe no presentaron diferencias significativas, pero si se vieron diferencias significativas entre parcelas y muestreos estudiados ($p < 0,001$), obteniéndose así resultados similares a los publicados por Dobón-Suárez (2020).

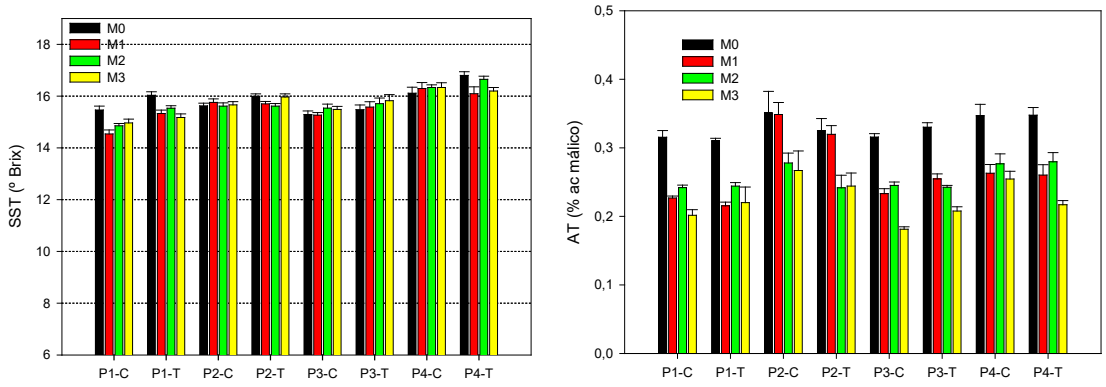


Figura 2. Sólidos solubles totales y acidez total de las granadas control y tratadas con JaMe 5 mM después de su almacenamiento. Los datos son la media ± ES.

En el momento de recolección de las distintas parcelas, se pudo apreciar que los frutos de los árboles tratados presentaban una mayor firmeza con respecto a los árboles control de forma significativa ($p < 0,001$). Durante la conservación, la firmeza de la granada se redujo significativamente durante el tiempo de almacenamiento (Figura 3), sin embargo, se puede apreciar que las granadas que fueron previamente tratadas en campo presentaban una menor disminución de dicha firmeza con respecto al control.

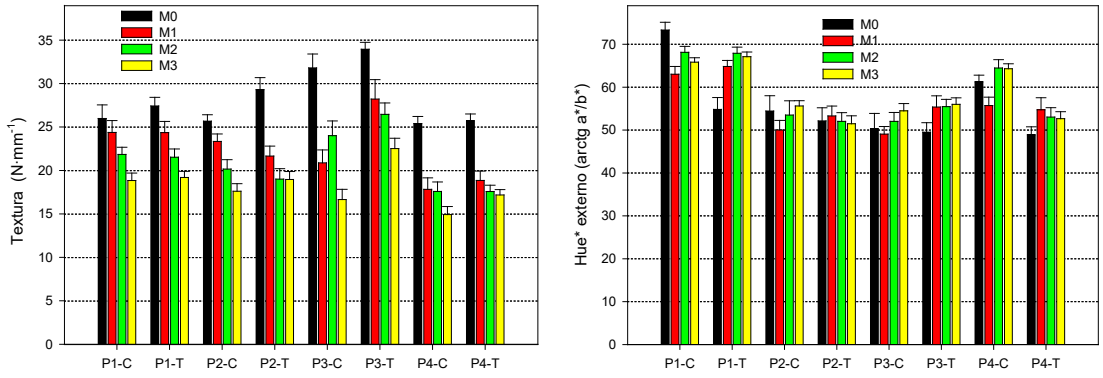


Figura 3. Firmeza y color externo de las granadas control y las tratadas con JaAMe 5 mM después de su almacenamiento. Los datos son la media ± ES

Respecto al color externo de la granada se observaron diferencias significativas entre parcelas ($p < 0,001$) y entre tratamientos ($p < 0,05$). Los valores de color °hue* presentaron cambios durante la conservación en la granadas control y las granadas tratadas aumentando dichos

valores (Figura 3), esto puede ser debido a los mismos daños de senescencia que se relacionan con un amarilleamiento de la corteza y mostrando diferencias significativas entre muestreos. Efectos similares fueron encontrados en un trabajo recientemente publicados (García-Pastor et al., 2020a). No se observaron diferencias significativas entre el color interno de las granadas control y las tratadas.

Parámetros funcionales

Respecto a los fenoles (Tabla 2) no se obtuvieron diferencias significativas entre las granadas control y tratadas, sin embargo, entre parcelas y muestreos sí se observaron diferencias ($p <$ 0,001), produciéndose un aumento de los fenoles durante la conservación. Efecto similar ocurrió en granadas Mollar tratadas en postrecolección (Sayyari et al., 2011a).

No se obtuvieron diferencias significativas entre las antocianinas de las granadas tratadas y las de las granadas control, pero si se obtuvo un aumento significativo de las antocianinas durante los muestreos o tiempo de almacenado.

En la actividad antioxidante, tanto en fase hidrosoluble como en la fase liposoluble, se observó un aumento significativo conforme avanzaban los muestreos o días de almacenamiento (Tabla 2). Sin embargo, el tratamiento con JaMe no afectó significativamente a la actividad antioxidante, como es en este caso, ni al contenido de antocianos ni de fenoles totales. Esto puede ser principalmente debido a que la aplicación de JaMe en nuestro trabajo fue en un único pase a los 5 días previos a la recolección.

Fuga de electrolitos

La fuga de electrolitos proporciona una idea de la degradación de la membrana celular afectada por el efecto del frío. En la Figura 4 vemos que durante la conservación de las granadas se produjo una fuga de electrolitos conforme avanzaba la conservación en cámara. Bajo las condiciones de almacenamiento estudiadas, dicha fuga no fue muy elevada debido a las buenas condiciones de almacenamiento, no superando en el peor de los casos el 16 %, mientras que en otros trabajos donde se conservaron a 2 ºC la fuga de electrolitos fue muy superior durante el periodo de conservación superando el 50 % (Sayyari et al., 2011; Zapata et al., 2018; García-Pastor et al., 2020b).

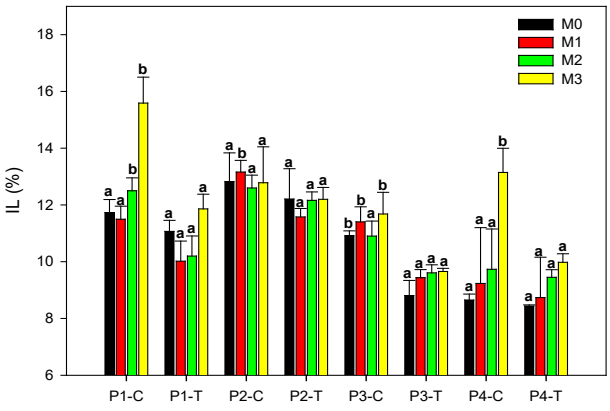


Figura 4. Evolución de los electrolitos en la piel de las granada control y tratadas con JaMe 5 mM durante la conservación. Los datos son la media ± ES. Las distintas letras muestran diferencias significativas entre tratamientos para un valor de $p < 0,05$ en cada parcela.

Dentro de este efecto de buena conservación, se observó como los frutos tratados con JaMe 5 mM presentaron una menor fuga de electrolitos, manteniéndose constante dicha fuga durante el periodo de conservación frente a los controles, los cuales mostraron un aumento significativo de la fuga de electrolitos al final del periodo de almacenamiento.

Daños por frío

En la Figura 5 podemos ver que, bajo las condiciones estudiadas, los frutos control presentaban daños por frío, pudiéndose observar diferencias significativas entre los frutos control y tratados en el último muestreo (M3). Estos daños son mucho menores a los producidos a temperaturas de 0-2 ºC según trabajos en granada Mollar (Zapata et al., 2018; García-Pastor et al., 2020a) y en estudios previos (Artés, Villaescusa y Tudela, 2000). En este último estudio, donde se realizó una comparativa entre la conservación a 0 ºC y 5 ºC más 7 días de shelf-life, se observó que los frutos conservados a 5 ºC presentaron un mínimo de daños, resultados muy similares a los nuestros. También cabría resaltar que los tratamientos con JaMe 5 días antes de la recolección tienen un efecto beneficioso, ya que reducen estos daños por frío a la mitad durante el período de conservación de las granadas en las parcelas estudiadas.

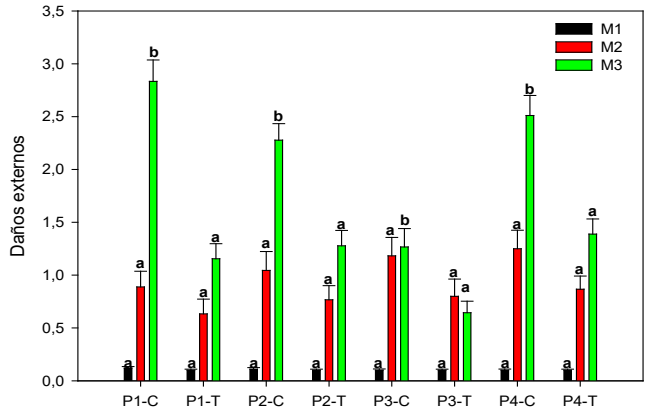


Figura 5. Evaluación de daños externos por frío "chilling injury" en granadas 'Mollar de Elche' control y tratadas con JaMe 5 mM en cámara de conservación. Los datos son la media ± ES. Las distintas letras muestran diferencias significativas entre tratamientos para un valor de $P < 0,05$ en cada parcela.

En cuanto a los daños internos producidos en los frutos (Figura 6), las granadas tratadas presentaron a lo largo de la conservación menores daños internos de manera significativa en comparación a las granadas control vemos que según la parcela hubo diferencias significativas con respecto al tratamiento a partir del segundo muestreo (M2). Por ejemplo, en la parcela 4 no existieron diferencias significativas ya que el tiempo en cámaras fue menor que en el resto de las parcelas (85 días de almacenamiento).

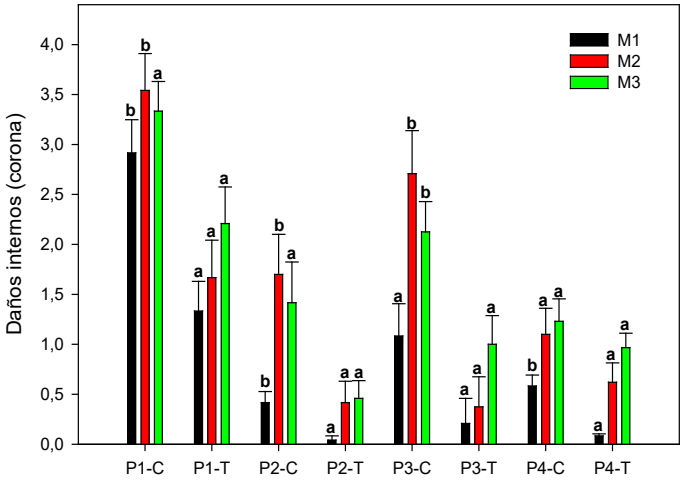


Figura 6. Evaluación de daños internos por frío en granada 'Mollar de Elche' control y tratadas con JaMe 5 mM en cámara de conservación. Los datos son la media ± ES. Las distintas letras muestran diferencias significativas entre tratamientos para un valor de $p < 0,05$ en cada parcela.

Conclusiones

En conclusión, hemos podido comprobar que el tratamiento con jasmonato de metilo (JaMe) 5 mM en una sola aplicación, 5 días antes de la recolección, mejoró significativamente la calidad postcosecha y la capacidad de almacenamiento de la granada 'Mollar de Elche'. En concreto, se han obtenido las siguientes conclusiones específicas:

• El tratamiento con JaMe 5 mM incrementó el contenido de los sólidos solubles totales (SST) y mantuvo la acidez total (AT) durante el almacenamiento, lo cual conlleva un incremento del índice de madurez de forma general.

• El tratamiento mejoró la firmeza de los frutos, así como redujo significativamente las pérdidas de firmeza frente a los frutos control.

• El color externo de la corteza de los frutos también se vio mejorado por el tratamiento, mejorando el color y aspecto.

• Los tratamientos con JaMe 5 mM ayudaron a que la fuga de electrolitos o 'ion leakage' (IL) provocada por los daños por frío no incrementase durante el período de conservación industrial.

• Con respecto a los daños por frío o "chilling injury" (CI) producidos durante la conservación, se observó que las granadas tratadas con JaMe 5 mM presentaron una incidencia a estos daños significativamente inferior a las no tratadas, manteniendo el buen aspecto de las mismas al final del período del almacenamiento.

Finalmente, en este trabajo se ha podido observar que con un solo tratamiento de JaMe a la concentración 5 mM y 5 días previos a la recolección, es posible mantener la calidad de la granada, definida principalmente por parámetros como el color, la firmeza, los SST, y los daños por frío. Por todo ello, este tratamiento es efectivo para su aplicación industrial ya que mejora todas las características citadas, las cuales son las que más influyen al consumidor en la decisión de compra.

Agradecimientos

Generalitat Valenciana (2020/VALORIZA/VSC/020) y a las empresas colaboradoras HEBEGU S.L., Francisco Oliva S.L., Hermanos Fuentes C.B. y Antonio García Bernabeu.

Bibliografía

Aghdam, M.S., Bodbodak, S. (2013). Physiological and biochemical mechanisms regulating chilling tolerance in fruits and vegetables under postharvest salicylates and jasmonates treatments. Sci. Hortic. 156, 73–85. DOI: 10.1016/j.scienta.

Artés, F., Villaescusa, R., Tudela, J.A. (2000). Modified atmosphere packaging of pomegranate. J. Food Sci. 65, 1112-1116. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10248.x.

Chen, J.Y., He, L.H.; Jiang, Y.M.; Wang, Y.; Joyce, D.C.; Ji, Z.L.; Lu, W.J. (2008). Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. Physiol. Plantarum. 132: 318–328. DOI:10.1111/j.1399-3054.2007.01013.x.

Dobón-Suárez, A.; García-Pastor, M.E.; Codes-Alcaraz, A.M.; Castillo, S. (2020). Componentes de calidad sensorial, caracterización físico-química y funcional de la granada Mollar de Elche (*Punica granatum* L.). Actas I Congreso Universitario en Innovacion y Sostenibilidad Agroalimentaria. 493-504.

García-Pastor, M.E.; Serrano, M. Guillén, F.; Zapata, P.J.; Valero, D. (2020a). 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 Biol. Technol. 167, 111226. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2020.111226.

García-Pastor, M.E.; Serrano, M. Guillén, F.; Giménez, M.J.; Martínez-Romero, D.; Valero, D. Zapata, P.J.; (2020b). Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche at harvest and during postharvest storage. J. Sci. Food Agric. 100: 145–153. DOI 10.1002/jsfa.10007.

Gil, M.I.; Sánchez, R.; Marín, G. Artés, F. (1996). Quality changes in pomegranates during ripening and cold storage. Z Lebensm Unters Forch 202, 481–485. https://doi.org/10.1007/BF01197269.

Glowacz, M., Ree, D. (2016). Using jasmonates and salicylates to reduce losses within the fruit supply chain. Eur. Food Res. Technol. 242, 143–156 (2016). https://doi.org/10.1007/s00217-015-2527-6..

Kader, A.A. (2006). Postharvest biology and technology of pomegranates. In Pomegranates. Ancient roots to modern medicine (pp 211-218). Seeram, N.P., Schulman, R.N., & Heber. D., Eds.: Boca Raton: CRC Press-Taylor & Francis.

Martínez-Romero, D., Serrano, M., Carbonell, A., Burgos, L., Riquelme, F. Valero, D. (2002). Effects of postharvest treatment on extending shelf life and reducing mechanical damage in apricot. J. Food Sci. 67, 1706-1712. DOI:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08710.x.

Pareek, S., Valero, D., Serrano, M. (2015). Postharvest biology and technology of pomegranate. J. Sci. Food Agric. 95, 2360–2379. DOI: 10.1002/jsfa.7069.

Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz Mula, H.M., Serrano, M. (2011). Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. Postharvest Biol. Technol. 60 (2), 136-142. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2010.12.012.

Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D. (2011a). Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. Food Chem. 124, 964–970. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.07.036.

Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D. 2005 Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages J. Agric. Food Chem. 53, 7 , 2741-2745 https://doi.org/10.1021/jf0479160.

Serrano, M., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J. M., Valero, D. (2009a). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. J. Agric. Food Chem. 57, 8, 3240-3246. doi: 10.1021/jf803949k.

Serrano, M., Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., (2009b). Changes in hydrophilic and lipophilic antioxidant activity and related bioactive compounds during postharvest storage of yellow and purple plum cultivars. Postharvest Biol. Technol . 51 (3), 354-363. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.007.

Serrano M, Martínez-Esplá A, Zapata P, Castillo S, Martínez-Romero D, Guillén F et al., (2018). Effects of methyl jasmonate treatment on fruit quality properties, in Emerging Postharvest Treatment of Fruits and Vegetables, ed. by Barman K, Sharma S and Siddiqui MW. Apple Academic Press, Oakville, pp. 85–106 (Chapter 4).

Valero, D., Pérez-Vicente, A., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Serrano, M. (2002). Plum storability improved after calcium and heat postharvest treatments: role of polyamines. J. Food Sci. 67, 2571-2575. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08778.x.

Valero, D. (2010). Innovaciones en los tratamientos post-recolección de granada. Jornadas nacionales sobre el granado: 143-151.

Zapata, P. J.; Guillén, F.; Giménez-Torres, M. J.; Valero, D.; Serrano, M.; García-Pastor, M. E.; Castillo, S. (2018). Efecto en la calidad de las granadas recolectadas en dos periodos y conservadas durante 3 meses a 2 condiciones de temperatura. IX Congreso Ibérico / VII Congreso Iberoamericano de las Ciencias y Técnicas del Frío CYTEF 2018, 1219.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Efecto de la aplicación poscosecha de nitroprusiato sobre la calidad de limón ecológico

A. Del Cerro, M.J. Giménez y P.J. Zapata

Dept. Tecnología Agroalimentaria. EPSO, Universidad Miguel Hernández. Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante. E-mail: alvaro.cerro@goumh.umh.es

Resumen

España es el primer exportador mundial de cítricos para el consumo en fresco. Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de poscosecha constituyen uno de los principales problemas del sector español de los cítricos. Las enfermedades poscosecha en cítricos son controladas aplicando fungicidas químicos en los almacenes antes de su conservación. Sin embargo, la creciente preocupación social de los peligros para la salud y el medio ambiente relacionados con el uso de tratamientos químicos de síntesis ha hecho que aumente la demanda de productos ecológicos, haciendo necesario el desarrollo de métodos alternativos no contaminantes. El nitroprusiato de sodio (NPS) es un donante de óxido nítrico (ON) en solución acuosa, compuesto que regula diversos procesos en las plantas, incluyendo crecimiento, desarrollo y defensa de las plantas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tratamientos poscosecha con NPS en limón sobre la calidad durante la conservación en frío. Los limones ecológicos de la variedad Primofiori fueron sumergidos en una disolución acuosa de NPS 0,1 y 0,5 mM durante 5 minutos. Los resultados mostraron que la aplicación de NPS en poscosecha retrasó las pérdidas de calidad en los frutos e incremento la resistencia reduciendo las podredumbres en frutos. Por tanto, la aplicación poscosecha de NPS podría ser una herramienta eficaz para mantener la calidad y extender la vida útil en limón ecológico.

Palabras clave: pérdida de peso, firmeza, podredumbres, compuestos bioactivos.

Effect of the post-harvest application of sodium nitroprusside on the quality of bio lemon

Abstract

Spain is the world's leading exporter of citrus fruits for fresh consumption. The economic losses caused by post-harvest diseases constitute one of the main problems of the Spanish citrus sector. Postharvest diseases in citrus fruits are controlled by applying chemical fungicides in warehouses before their conservation. However, the growing social concern about the dangers to health and the environment related to the use of synthetic chemical treatments has increased the demand for organic products, making it necessary to develop alternative non-polluting methods. Sodium nitroprusside (NPS) is a nitric oxide (NO) donor in aqueous solution, a compound that regulates various processes in plants, including plant growth, development and defense. The objective of this work was to evaluate the effect of postharvest treatments with NPS in lemon on quality during cold storage. The organic lemons of the Primofiori variety were immersed in an aqueous solution of 0.1 and 0.5 mM NPS for 5 minutes. The results showed that the application of NPS in postharvest delayed the losses of quality in the fruits and increased the resistance reducing the rottenness in fruits. Therefore, the postharvest application of NPS could be an effective tool to maintain quality and extend shelf life in organic lemon.

Keywords: weight loss, firmness, rot, bioactive compounds.

Introducción

El limonero (*Citrus limon* L.) es la tercera especie de cítricos más importante del mundo por detrás del naranjo y el mandarino. Es un árbol de hoja perenne y espinoso de la familia de las Rutáceas. Esta especie se desarrolla de manera eficaz en climas templados y tropicales, cultivándose actualmente en todo el mundo. España y, principalmente la Región de Murcia, es uno de los principales productores de limón en todo el mundo, siendo España el segundo país que más produce del mundo, solo por detrás de Argentina, superando a países con mucha mayor superficie como Estados Unidos o Sudáfrica. Sin embargo, España asciende al primer puesto, con un 20 % de producción mundial de limón. Por otro lado, España mantiene el segundo lugar dedicando un 12 % a la industria de zumos.

La producción ecológica, también llamada biológica u orgánica, es un sistema de gestión y producción agroalimentaria que combina las mejores prácticas ambientales junto con un elevado nivel de biodiversidad y de preservación de los recursos naturales, así como la aplicación de normas exigentes sobre bienestar animal, con la finalidad de obtener una producción conforme a las preferencias de determinados consumidores por los productos obtenidos a partir de sustancias y procesos naturales. La agricultura ecológica se ha convertido en prácticamente imprescindible para poder dar respuesta a las exigencias de unos consumidores cada vez más interesados por llevar una alimentación lo más sana y natural posible. Con respecto al cultivo de limón ecológico, la superficie cultivada ha crecido un 386 % entre 2012 y 2020, hasta alcanzar las 8.300 hectáreas, representando cerca de un 17 % del área cultivada en España para la producción de limón.

Los trastornos fisiológicos y patológicos de los limones son las principales causas de pérdida de calidad durante la vida útil que conlleva grandes pérdidas económicas. Las principales enfermedades poscosecha de los cítricos cultivados en climas mediterráneos está causada por *Penicillium digitatum* (moho verde) y *Penicillium italicum* (moho azul). La incidencia de estas podredumbres es elevada, y supone generalmente más del 80% del total de las pérdidas por podredumbres. Actualmente, estas enfermedades poscosecha en cítricos son controladas aplicando fungicidas químicos como imazalil, orto-fenilfenato de sodio o tiabenzadol, en los almacenes antes de su conservación (Martínez-Jávega et al., 1995). Sin embargo, el desarrollo de resistencias junto con la creciente preocupación social de los peligros para la salud y medio ambiente asociados con la gran cantidad de pesticidas usados, han aumentado el interés por el desarrollo de métodos alternativos no contaminantes, alternativos y naturales para el control enfermedades (López-Reyes et al. 2013).

Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de la aplicación de tratamientos poscosecha con NPS a dos concentraciones (0,1 y 0,5 mM) en limón ecológico, sobre la calidad durante 35 días de conservación a dos temperaturas de refrigeración, 8 ºC como temperatura óptima, y 2 ºC como temperatura que genera daños por frío.

Material y Métodos

Material Vegetal y Diseño experimental

Los ensayos se llevaron a cabo con limón ecológico de la variedad primofiori procedentes de una finca comercial. Los limones fueron recolectados el 9 de marzo de 2021 y almacenados en cajas de 20 kg en cámaras de refrigeración a 9 ºC y 90 % de Humedad relativa. El 11 de marzo se transportaron los limones a los laboratorios de Universidad Miguel Hernández. Se realizaron tratamientos poscosecha con nitroprusiato de sodio a las concentraciones 0,1 y 0,5 mM. Los tratamientos se realizaron mediante baños (dipping) durante 5 minutos, y los lotes control (sin tratamiento) fueron bañados con agua para observar si existían diferencias. Tras realizar los tratamientos, cada lote fue organizado en una caja con 3 réplicas de 8 limones, Todos los lotes fueron almacenados a 2 y 8 ºC. Se realizaron en total 5 muestreos, a los 7, 14, 21, 28 y 35 días.

Para cada fecha de muestreo y tratamiento, se tomaron 3 lotes de 8 limones cada uno para realizar las siguientes determinaciones analíticas: peso, color (croma), firmeza, contenido en sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT). Además, se determinó el contenido en compuestos bioactivos

(fenoles totales, antocianinas totales y carotenoides totales), actividad antioxidante total (tanto en la fracción hidrosoluble como liposoluble).

Determinaciones Analíticas

La tasa de respiración se determinó utilizando un sistema estático, colocando los limones en un recipiente de 1 L, de cierre hermético, durante 1 hora. La concentración de CO_2 se midió utilizando un cromatógrafo de gases ShimadzuTM GC-14B (Kyoto, Japon) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) (Martínez-Esplá et al., 2018). Los resultados fueron la media ± ES y fueron expresados como mg CO_2 kg^{-1} h^{-1}.

El peso se determinó mediante una balanza Radwag WLC 2/A2 (Radwag Wagi Elektroniczne) con 2 cifras decimales de precisión y se expresó en gramos. Se pesaron los frutos cada día de muestreo y se compararon con los pesos que poseían el día 0. La determinación de pérdida de peso se expresó en % con respecto al peso inicial y los resultados son la media ± ES de los tres lotes. La firmeza se determinó independientemente en cada uno de los limones usando un Texturómetro TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, UK), aplicando una deformación del 5 % del diámetro del fruto. Los resultados se expresaron como la relación fuerza-deformación (N mm^{-1}) y fueron la media ± ES. Los cambios de color se determinaron mediante colorimetría (L*, a*, b), usando un colorímetro Minolta (CRC 200, Minolta Camera Co., Japón). Los resultados se expresaron en función de los parámetros a* y b*. Los sólidos solubles totales (SST) se midieron mediante refractometría sobre el zumo obtenido cada R (8 limones) por 3 réplicas, y por duplicado. Para ello se utilizó un refractómetro digital Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japón) a 20 °C, y se expresaron como g 100 g^{-1} (media ± ES). La acidez total (AT) se determinó por duplicado en el mismo zumo mediante titulación automática con un pH metro 785 DMP Titrino (Metrohm) de sensibilidad ± 0,01 pH. Se valoró con NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,1, usando 0,5 mL de zumo diluido en 25 mL de agua destilada. Los resultados son el valor medio ± ES y se expresaron como g ácido málico equivalente 100 g $^{-1}$ de peso fresco.

La extracción de fenoles se realizó homogenizando 2 g de corteza con 10 mL agua: metanol (2:8= contenido FNa 2 mM. Los fenoles totales fueron determinados usando el reactivo Folin-Ciocalteau según el protocolo Serna et al. (2019). Los resultados fueron la media ± ES y fueron expresados como mg de ácido gálico equivalente 100 g^{-1} peso fresco. La actividad antioxidante total (AAT) fue cuantificada de acuerdo con Martínez Esplá et al. (2018), que permite determinar en la misma extracción, la AAT debida tanto a los componentes hidrofílicos (AAT-H) como lipofílicos (AAT-L) en la misma extracción usando el sistema enzimático ABTS-peroxidasa. Los resultados se representaron como la suma de AAT-H y AAT-L, y fueron expresados como mg de Trolox equivalentes (TE) 100 g^{-1} de peso fresco.

Finalmente, se determinó la incidencia de podredumbres. Semanalmente, coincidiendo con los días de muestreo, se realizó el recuento de limones podridos para cada uno de los tratamientos realizados y almacenados a 2 y 8 ºC. Los resultados se expresan como % de podrido acumulado con respecto a 120 limones utilizados durante los 35 días de conservación (8 limones x 3 réplicas x 5 muestreos).

Resultados y Discusión

La tasa de respiración al inicio del ensayo fue de 6,078 ± 0,313 mg CO_2 $kg^{-1}h^{-1}$. Tras la realización de los tratamientos se almacenaron en cámara y se muestrearon semanalmente. Durante la primera semana de conservación no se observaron diferencias entre los tratamientos ni entre la temperatura de almacenamiento; sin embargo, a partir de los 14 días se observaron diferencias entre los limones tratados y control para ambas temperaturas de conservación (2 y 8 °C) (Figura 1. La tasa de respiración fue menor cuando se almacenaron los limones a menor temperatura (2 °C), ya que el frío ralentiza la respiración, así como otras reacciones bioquímicas y enzimáticas, ralentizando el deterioro de los frutos (Cohen y Schiffmann-Nadel, 1978).

Los limones tratados con NPS 0,1 mM presentaron menor tasa de respiración que los tratados con la concentración 0,5 mM y los controles, y fueron los controles los que presentaron la mayor tasa de respiración al final del periodo de almacenamiento refrigerado. Por otro lado, los limones conservados

a 8 °C mostraron una mayor tasa de respiración, y se observó una evolución similar en los limones conservados a 2 °C, siendo los limones tratados con la concentración NPS 0,1 mM la que menor tasa de respiración mostró. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los limones tratados con NPS 0,5 mM y control durante los 35 días de almacenamiento a 8 ºC.

La disminución de la tasa de respiración de los limones tratados con NPS 0,1 mM indica que el ON podría ralentizar la senescencia de los limones al retardar la frecuencia respiratoria para prolongar la vida útil de los frutos. Estos resultados son coincidentes con los encontrados en peras (Adhikary et al., 2021).

La tasa de respiración en frutos recién recolectados es alta, y disminuye drásticamente durante el periodo de almacenamiento refrigerado; sin embargo, la tasa de respiración inicial de los limones utilizados en este trabajo de investigación fue baja, e incrementó durante el periodo de conservación, ya que se utilizaron limones que estaban previamente conservados en cámara en la industria.

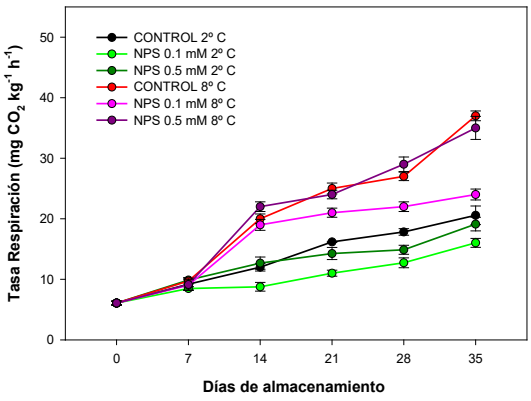


Figura 1. Evolución de la tasa de respiración en limones tratados con NPS (0,1 y 0,5 mM) y limones control almacenados a 2º y 8 ºC durante 35 días.

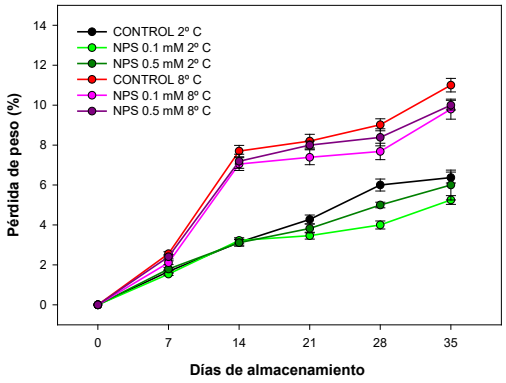


Figura 2. Pérdida de peso (%) en limones tratados con NPS (0,1 y 0,5 mM) y limones control, almacenados a 2º y 8 ºC durante 35 días.

La temperatura influye directamente sobre la respiración, siendo mayor cuanto mayor es la temperatura. Por tanto, la aplicación de temperaturas bajas durante la conservación reduce la respiración y ayuda a mantener su vida útil poscosecha. Por otro lado, la temperatura también afecta a la transpiración del fruto. Temperaturas elevadas provocan una mayor transpiración del producto que se traduce en pérdidas de agua del fruto y, por tanto, en pérdidas de peso y firmeza, disminuyendo así su valor comercial. La evolución de las pérdidas de peso durante 35 días de almacenamiento refrigerado se muestra en la Figura 2. Durante las dos primeras semanas de conservación, no se observaron diferencias en las pérdidas de peso entre los limones tratados y limones control en ninguna de las temperaturas ensayadas. Sin embargo, a partir de los 21 días de ensayo se observaron diferencias. Las pérdidas de peso de los limones tratados con NPS fueron menores que en los limones control tanto en los limones conservados a 2 ° como a 8 °C. Las menores pérdidas de peso se

produjeron en los limones tratados con NPS 0,1 mM para ambas temperaturas de conservación. Los limones almacenados a 2 ºC, los que sufrieron menor pérdida de peso durante los 35 días de almacenamiento, ya que a temperaturas bajas de refrigeración se reducen considerablemente las pérdidas de peso debido a una reducción en la respiración y transpiración de los cítricos (Undurraga y Olaeta, 2007).

La firmeza de los limones al inicio del ensayo fue de 9,23 ± 0,29 N mm-1. Durante el periodo de conservación se produjo una disminución de la firmeza en todos limones y para ambas temperaturas de conservación, pero esta disminución fue menor en los frutos tratados con NPS 0,1 mM (Figura 3). Estos resultados son coincidentes con la reducción de las pérdidas de firmeza observada por otros autores en pera y arándanos cuando se aplicó NPS en poscosecha (Adhikary et al., 2021; Dai et al., 2021). Las menores pérdidas de peso se produjeron en los limones conservados a 2 °C debido a la reducción en la tasa de respiración y transpiración comentada anteriormente. Las tasas de respiración más altas dan lugar a una mayor actividad de enzimas relacionadas con el ablandamiento y pérdidas de calidad en manzana (Chen et al., 2019).

La firmeza del limón está relacionada con la turgencia celular y el grosor de la piel, y es uno de los factores fundamentales que determinan la aceptación comercial de los cítricos (Grierson, 2006). Los principales componentes de la pared celular del flavedo y albedo son las pecinas, hemicelulosa y celulosa, y su despolimerización por la acción de enzimas hidrolíticas de la pared celular, principalmente poligalacturonasas, pectin metil esterasas y celulasas está directamente relacionada con el ablandamiento de los frutos. La disminución irreversible de la firmeza es una manifestación del ablandamiento producido durante proceso de maduración. Los resultados obtenidos son coincidentes con los obtenidos en investigaciones previas donde el tratamiento con ON, siendo el NPS un donante de ON conocido, ha mostrado ser una tecnología efectiva reduciendo las pérdidas de firmeza en pera (Adhikary et al., 2021), arándanos (Dai et al., 2021) y melocotón (Jiao y Duan, 2019), retrasando así la senescencia.

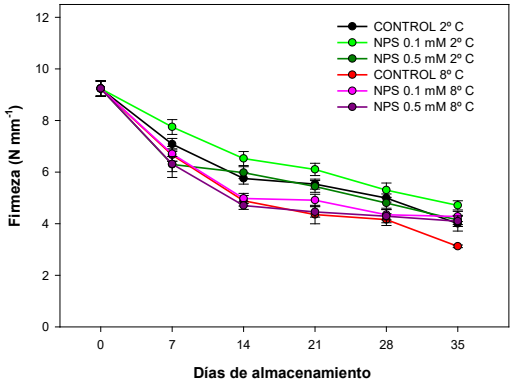


Figura 3. Evolución de la firmeza en limones tratados con NPS (0,1 y 0,5 mM) y limones control, almacenados a 2º y 8ºC durante 35 días.

El color de la fruta de los cítricos depende de tres principales grupos de pigmentos naturales: clorofilas, carotenoides y antocianinas (Artés et al., 2002). Los carotenoides imparten el color amarillo característico en el limón, pero coexisten con la clorofila que son pigmentos de color verde. Los cambios de color en los cítricos son atribuidos a la degradación de los pigmentos de clorofila y acumulación de carotenoides en el flavedo que ocurren en el proceso de maduración y que dan lugar cambios de color del fruto de verde a amarillo (Richardson y Cowan, 1995; Alós et al., 2006).

Los principales parámetros de color L*, a*, b*, C* en el limón aumentan y hº disminuye del estado verde a amarillo durante los periodos de almacenamiento en frío (Sun et al., 2019). Los limones utilizados en este ensayo de investigación fueron limones que presentaban una coloración amarilla puesto que se encontraban en condiciones óptimas de comercialización.

El parámetro de color a* representa la variación de color verde (-a) al rojo (+a). Al inicio del ensayo los limones presentaron un valor de a* de 0,056 ± 0,32. Se observó un incremento del parámetro a* en

todos los tratamientos durante el periodo de almacenamiento debido a los cambios de color característicos ocurridos durante el proceso de maduración. La coordenada colorimétrica a* se ha definido como el parámetro que más se correlaciona con el cambio de color del limón (Conesa et al., 2015). Los limones conservados a 2 °C y tratados con NPS 0,1 mM presentaron una menor evolución de color con respecto a los limones control, alcanzando un valor de a* de 1,61 ± 0,41 a los 35 días de almacenamiento; sin embargo, los limones tratados con NPS 0,5 mM mostraron un gran incremento de a* con valores finales de 5,07 ± 0,69, siendo estos valores similares a los de los limones almacenados a 8 ºC (Figura 4A). La menor evolución del parámetro de color a* en los limones tratados con NPS a 0,1 mM y almacenados a 2 ºC están relacionados con una ralentización del proceso de maduración.

Cuando los limones se conservaron a 8 ºC, no se observaron diferencias para el parámetro a* en los limones controles y los tratados con NPS 0,1 mM, alcanzando valores cercanos a 2,7 en ambos casos, mientras que los limones tratados con NPS 0,5 mM evolucionaron de forma más rápida con valores finales de 4,64 ± 0,50.

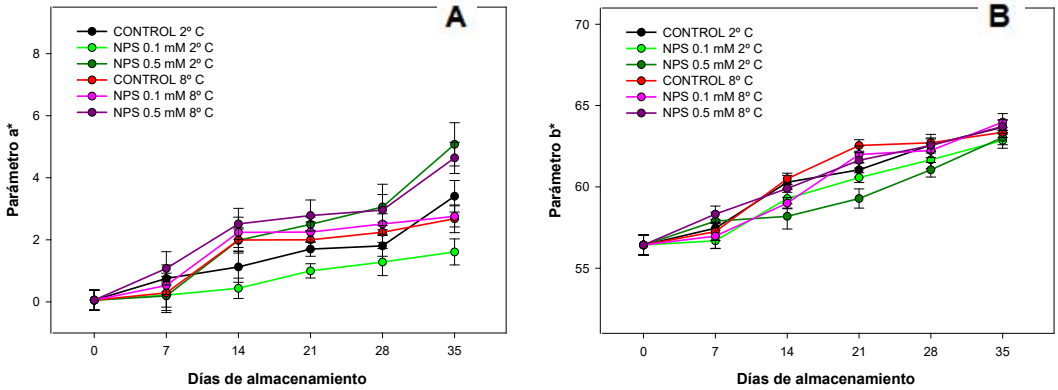


Figura 4. A) Evolución del color (parámetro a*); B) evolución del color (parámetro b*), en limones tratados con NPS (0,1 y 0,5 mM) y limones control, almacenados a 2º y 8 ºC durante 35 días.

Por otro lado, el parámetro b* representa la variación de color de azul (-b) a amarillo (+b). Al inicio del ensayo los limones presentaron un valor de b* de 56,43 ± 0,60. Se produjo un aumento del parámetro b* en todos los limones tratados y controles durante los 35 días de almacenamiento refrigerado, tanto a 2 como a 8 ºC (Figura 4B). En los limones almacenados a 2 ºC se produjo una ralentización del incremento de b* en los limones tratados con NPS a 0,1 y 0,5 mM desde los 14 a los 28 días de conservación con respecto a los limones control; sin embargo, no se observaron diferencias entre control y tratados a los 35 días de conservación. Del mismo modo, entre los limones conservados a 8 ºC se observaron diferencias en el parámetro b* entre limones tratados y control en distintas fechas de muestreo, pero no se observaron diferencias al final del ensayo de conservación (35 días).

La cantidad de SST y AT son parámetro clave para evaluar la calidad de un limón. El contenido en SST se asocia con la calidad de consumo de la fruta madura, ya que afecta al sabor y a la palatabilidad, se utiliza como índice de madurez en las mediciones de calidad (González-Molina et al., 2010). Los limones presentaron una concentración de SST de 7,13 ± 0,06 al inicio del experimento (día 0). Se observó una ligera disminución durante el periodo de conservación de la concentración de SST en todos frutos tratados y control, y en ambas temperaturas de conservación. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratamientos con respecto a los frutos control, para ninguna de las dos temperaturas de conservación (Figura 5A).

Como se ha comentado anteriormente, la AT juega un papel importante a la hora de determinar la calidad de un fruto. La acidez total al inicio del ensayo fue de 5,53 ± 0,05 %. La AT siguió un patrón similar a los SST observándose un leve descenso durante el periodo de almacenamiento refrigerado. No se observaron diferencias entre tratamientos ni entre la temperatura de conservación, excepto en el tratamiento NPS 0,1 mM cuando se conservó a 2 ºC, ya que sufrió un menor descenso de acidez al final de los 35 días de conservación (5,32 ± 0,07 %) (Figura 5B). Este resultado es coincidente con estudios previos en los que la aplicación de NPS mantuvo los niveles de acidez total (Sun et al., 2019).

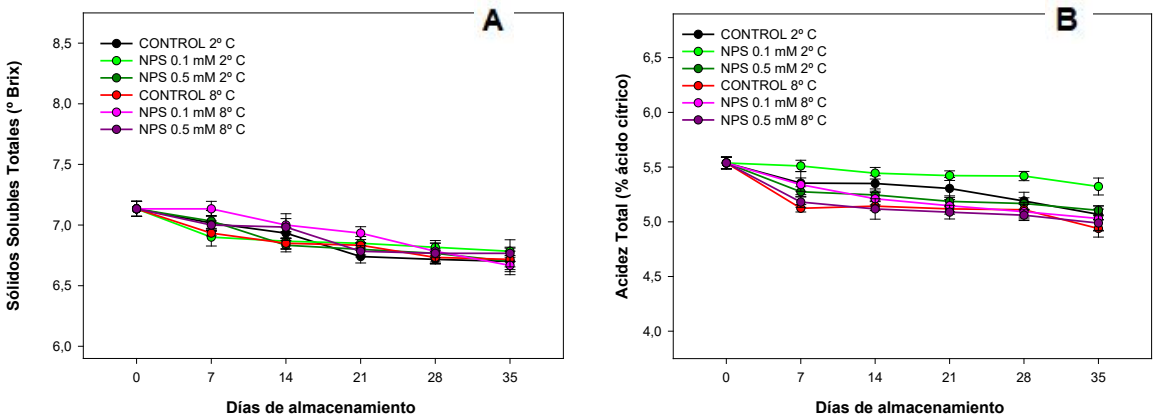


Figura 5. A) Evolución de sólidos solubles totales (SST); B) Evolución de la acidez total (% ácido cítrico), en limones tratados con NPS (0,1 y 0,5 mM) y limones control, almacenados a 2º y 8 ºC durante 35 días.

Los ácidos orgánicos individuales son un parámetro de madurez que juega un papel muy importante en el desarrollo del sabor del fruto. Los principales ácidos orgánicos del limón son el ácido cítrico, málico, succínico y fumárico. La AT de los limones presentan una tendencia a la baja cuando cambian de color verde a amarillo debido a una disminución de los ácidos orgánicos individuales ya que son utilizados como substrato por la enzima piruvato descarboxilasa en el proceso de maduración. Por el contrario, durante el almacenamiento refrigerado existe una tendencia general del aumento de la AT que puede atribuirse a numerosos procesos. Sin embargo, los resultados obtenidos en este ensayo de investigación fueron contrarios a otros estudios donde determinaron que durante el periodo de almacenamiento en frío de limones amarillos aumentaba la AT debido a la pérdida de peso provocada por la pérdida de agua del fruto durante la conservación (Kaur et al., 2014; Sun et al., 2019).

La frutas y vegetales contienen una amplia gama de compuestos con actividad antioxidante, siendo algunos de los más comunes los compuestos fenólicos como las antocianinas, carotenoides, vitaminas (C y E) y glucosinolatos (Valero y Serrano, 2010). Los principales flavonoides identificados en limón han sido las flavanonas herperidina y eriocitrina (Serna-Escolano et al., 2021), que representan el 90 % del total de los fenoles (Del Río et al., 2004; Dong et al., 2019). En la Figura 6A se representan los fenoles totales al inicio del ensayo poscosecha (240,97 ± 5,06 mg GAE 100 g^{-1}) y su evolución durante los 35 días de almacenamiento refrigerado para todos los limones tratados con NPS a 0,1 y 0,5 mM con respecto a los controles, y conservados a dos temperaturas (2 y 8 ºC). En general, se observó un ligero incremento en el contenido en fenoles durante todo el periodo de almacenamiento para los limones tratados y control. Cuando los limones se conservaron a 2 ºC no se observaron diferencias en el contenido fenólico entre los limones tratados con NPS 0,1 mM y los limones control, y fueron los limones tratados con NPS 0,5 mM los que mayor aumento en fenoles presentaron. Por el contrario, cuando los limones se almacenaron a 8 ºC fueron los limones tratados con NPS 0,1 mM los que mostraron mayor contenido fenólico durante los 35 días de almacenamiento, mientras que, no se observaron diferencias entre los limones control y los tratados con NPS 0,5 mM. Investigaciones previas han mostrado que la aplicación de NPS fue efectiva incrementando el contenido en fenoles totales y ácido ascórbico en pera (Adhikary et al., 2021).

En cuanto a la AAT, se observó una tendencia similar a la observada para los fenoles totales ya que existe una estrecha correlación entre el contenido fenólico y la AAT (Xu et al., 2008). La actividad antioxidante total inicial fue de unos 230 mg 100 g^{-1} peso fresco. En general, se observó un incremento en la AAT durante todo el periodo de almacenamiento para los limones tratados y control. Cuando los limones se conservaron a 2 ºC se observaron diferencias en el contenido fenólico entre los limones tratados con NPS y los limones control, y no se observaron diferencias entre la concentración aplicada. Por el contrario, cuando los limones se almacenaron a 8 ºC fueron los limones tratados con NPS 0,1 mM los que mostraron mayor contenido fenólico durante los 35 días de almacenamiento, mientras que, no se observaron diferencias entre los limones control y los tratados con NPS 0,5 mM (Figura 6B). Estos resultados son coincidentes con los encontrados en otros trabajos donde la aplicación de

NPS incrementó la actividad antioxidante relacionada con un aumento del contenido de antocianinas en arándanos (Ge et al., 2019). Los compuestos fenólicos, junto con el ácido ascórbico, son los principales compuestos responsables de las propiedades antioxidantes atribuidas al consumo de limón (Asencio et al., 2018; Oboh et al., 2015). Algunos autores han encontrado una estrecha correlación entre la AAT y los fenoles totales, confirmando las relaciones entre los compuestos fenólicos de tejidos vegetales y su capacidad de eliminar los radicales libres (Xu et al., 2008; Dong et al., 2019). En el caso de los cítricos, la actividad antioxidante no solo depende de la concentración de cada compuesto individual, sino también de la interacción entre ellos (Xi et al., 2017).

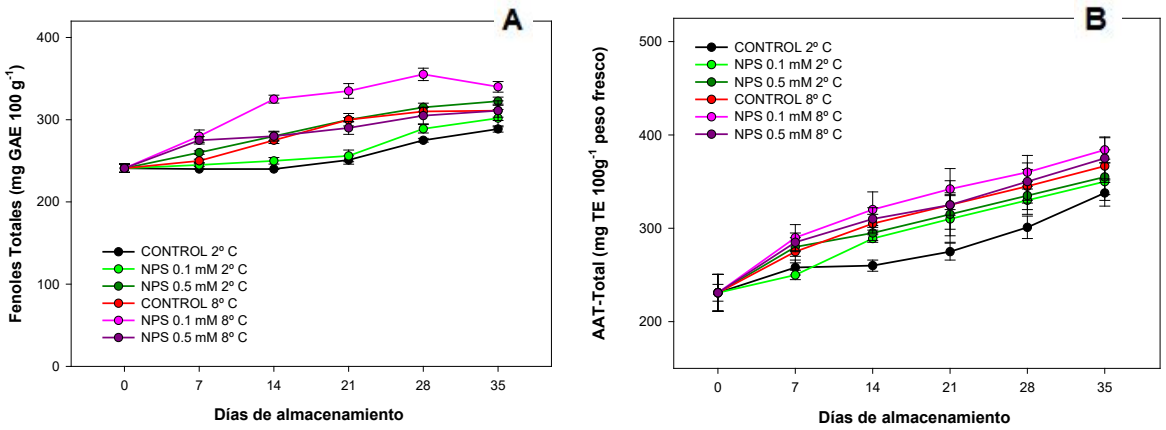


Figura 6. A) Evolución de la concentración de fenoles totales (mg GAE $100g^{-1}$); B) Evolución de la Actividad Antioxidante Total (mg Trolox equilavente $100g^{-1}$), en limones tratados con NPS (0,1 y 0,5 mM) y limones control, almacenados a 2º y 8 ºC durante 35 días.

Se calculó el porcentaje de podrido acumulado durante los 35 días de duración del ensayo. No se observaron limones podridos en los frutos tratados con NPS 0,1 y 0,5 mM, y el porcentaje de limones control fue menor del 1 % cuando se almacenaron a 2 °C. Sin embargo, cuando se almacenaron a 8 °C, se pudrieron un 5 % de limones control, y se redujo en un 50 % cuando se trataron con NPS 0,5 mM, siendo está reducción mayor cuando se trató con NPS 0,1 mM (Tabla 1). Diversos estudios han demostrado que la aplicación de NPS disminuyó la incidencia de podredumbres en arándanos (Dai et al., 2021), melocotón (Jiao y Duan, 2019) y litchi (Barman et al., 2014). Por tanto, el tratamiento con NPS juega un papel importante en el mantenimiento de la calidad, en la reducción de podredumbres y en alagar la vida útil, reduciendo así las pérdidas económicas.

Tabla 1. Recuento frutos podridos (% acumulado) de limones tratados con NPS (0,1 y 0,5 mM) y limones control, durante 35 días de almacenamiento a 2 y 8 °C.

Temperatura conservación	**% Podrido**		
	Control	**NPS 01, mM**	**NPS 0,5 mM**
2 °C	0,83	0	0
8 °C	5,0	1,67	2,5

Por otro lado, no se observaron daños por frío en los limones tratados o control almacenados a 2 ºC ya que los limones se analizaron tras sacar los frutos de la cámara. Se ha observado que los síntomas de esta alteración fisiológica se hacen más evidentes cuando los frutos se transfieren a temperatura ambiente tras su exposición al frío, llegando incluso a no detectarse hasta que no tiene lugar este reacondicionamiento (Parkin et al., 1989). Diversos autores han observado que la aplicación de NPS ha sido efectiva reduciendo los daños por frío en ciruela, mango, melón y melocotón (Singha et al., 2009; Zaharah and Singh, 2011; Zhang et al., 2017; Ma et al., 2019; Gao et al., 2018).

Conclusiones

La aplicación de nitroprusiato de sodio a la concentración de 0.1 mM ha mostrado un efecto positivo en el mantenimiento de la calidad del limón durante su conservación poscosecha a dos temperaturas diferentes, 2 y 8 °C, durante 35 días desde su recolección. Sin embargo, este compuesto, aplicado a 0,5 mM no ha resultado efectivo, por lo que la dosis recomendada para su aplicación en poscosecha es la de 0,1 mM, ya que presenta las siguientes mejoras en los componentes de calidad:

- Menores pérdidas de peso y tasa de respiración
- Mantenimiento de la firmeza y color
- Mayor acidez titulable
- Incremento en contenido en fenoles y AAT
- Menor incidencia de podredumbres

Bibliografía

Adhikary, T., Gill, P., Jawandha, S., Bhardwaj, R., Anurag, R., 2021. Efficacy of postharvest sodium nitroprusside application to extend storability by regulating physico-chemical quality of pear fruit. Food Chemistry, 346, 128934. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128934

Alós, E., Cercós, M., Rodrigo, M.J., Zacarías, L., Talón, M., 2006. Regulation of colour break in citrus fruits. Changes in pigment profiling and gene expression induced by gibberellins and nitrate, two ripening retardants. J. Agric. Food Chem. 54 (13), 4888–4895. https://doi.org/10.1021/jf0606712

Artés, F., Minguez, M.I., Hornero, D., 2002. Analysing Changes in Fruit Pigments. Color in Food. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 248–282.

Asencio, A. D., Serrano, M., García-Martínez, S., Pretel, M. T., 2018. Organic acids, sugars, antioxidant activity, sensorial and other fruit characteristics of nine traditional Spanish Citrus fruits. European Food Research and Technology, 244, 1497–1508. https://doi.org/10.1007/s00217-018-3064-x

Barman, K., Siddiqui, M. W., Patel, V. B., Prasad, M., 2014. Nitric oxide reduces pericarp browning and preserves bioactive antioxidants in litchi. Scientia Horticulturae, 171, 71–77.

Chen, Y., Ge, Y., Zhao, J., Wei, M., Li, C., Hou, J., Cheng, Y., Chen, J., 2019. Postharvest sodium nitroprusside treatment maintains storage quality of apple fruit by regulating sucrose metabolism. Postharvest Biology and Technology, 154, 115- 120. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.04.024

Cohen, E., Schiffmann-Nadel, M., 1978. Storage capability at different temperatures of lemons grown in Israel. Scientia Horticulturae, 9, 251-257. https://doi.org/10.1016/0304-4238(78)90007-9

Conesa, A., Brotons, J.M., Manera, F.C., Castañer, R., Parras, I., 2015. El cambio de color de la corteza del limonero 'Verna' y 'Fino'. XIV Congreso de la SECH, Orihuela, 290-293.

Dai, H., Ji, S., Zhou, X., Wei, B., Cheng, S., Zhang, F., Wang, S., Zhou, Q., 2021. Postharvest effects of sodium nitroprusside treatment on membrane fatty acids of blueberry (*Vaccinium corymbosum,* cv. Bluecrop) fruit. Scientia Horticulturae, 288, 110307. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110307

Del Río, J. A., Fuster, M. D., Gómez, P., Porras, I., García-Lidón, A., Ortuño, A., 2004. *Citrus limon*: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. Food Chemistry, 84, 457–461.

Dong, X., Hu, Y., Li, Y., Zhou, Z., 2019. The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content. Scientia Horticulturae, 243, 281–289.

Gao, H., Lu, Z.M., Yang, Y., Wang, D.N., Yang, T., Cao, M.M., Cao, W., 2018. Melatonin treatment reduces chilling injury in peach fruit through its regulation of membrane fatty acid contents and phenolic metabolism. Food Chem. 245, 659–666. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.008

Ge, Y., Li, X., Li, C., Tang, Q., Duan, B., Cheng, Y., Hou, J., Li, J. (2019). Effect of sodium nitroprusside on antioxidative enzymes and the phenylpropanoid pathway in blueberry fruit. Food Chemistry, 295, 607–612.

González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2010. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. J. Pharm. Biomed. 51 (2), 327–345.

Grierson, W., 2006. Maturity and grade standards. In W. F. Wardowsk, W. M. Miller, D.J. Hall, W. Grierson (Eds.). Fresh citrus fruits (pp. 23–48). (Second Ed.). Longboat Key, FL: Florida Science Source Inc.

Guillén, F., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Valero, D., Serrano, M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., 2013. Aloe arborescens and Aloe vera gels as coatings in delaying postharvest ripening in peach and plum fruit. Postharvest Biol. Tec. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.03.011

Jiao, C.F., Duan, Y.Q., 2019. The mediation of NO-enhanced chilling tolerance by GSK-3 in postharvest peach fruit. Food Bioprocess. Tech., 12, 2028-2035. https://doi.org/10.1007/s11947-019-02367-y

Kaur, S., Jawandha, S.K., Singh, H., 2014. Response of Baramasi lemon to various postharvest treatments. Int. J. Agric. Environ. Biotechnol. 7 (4), 895–902. 10.5958/2230-732X.2014.01402.8

Lopez-Reyes, J.G., Spadaro, D., Prelle, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2013. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. J Food Prot 76:631–639.

Ma, Y.Y., Huang, D.D., Chen, C.B., Zhu, S.H., Gao, J.G., 2019. Regulation of ascorbateglutathione cycle in peaches via nitric oxide treatment during cold storage. Sci. Hortic. 247, 400–406.

Martínez-Esplá, A., Zapata, P. J., Valero, D., Martínez-Romero, D., Díaz-Mula, H. M., Serrano, M., 2018. Preharvest treatments with salicylates enhance nutrient and antioxidant compounds in plum at harvest and after storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98, 2742–2750.

Martínez-Jávega, J. M., Cuquerella, J., Navarro, P., 1995. Perspectiva actual de la tecnología postcosecha de frutos cítricos. Levante Agrícola 332:220-225.

Oboh, G., Bello, F., Ademosun, A., Akinyemi, A., Adewuni, T., 2015. Antioxidant, hypolipidemic, and anti-angiotensin-1-converting enzyme properties of lemon (*Citrus limon*) and lime (*Citrus aurantifolia*) juice. Comparative Clinical Pathology, 24, 1395–1406. https://doi.org/10.1007/s00580-015-2088-x

Parkin, K.L., Kuo, S.J., 1989. Chilling induced lipid degradation in cucumber fruit. Plant Physiol. 90:1049-1059.

Richardson, G.R., Cowan, A.K., 1995. Abscisic acid content of Citrus flavedo in relation to colour development. J. Hortic. Sci. 70 (5), 769–773.

Serna-Escolano, V., Valverde, J. M., García-Pastor, M. E., Valero, D., Castillo, S., Guillén, F., Serrano, M., 2019. Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(11), 5035–5043

Serna-Escolano, V., Martínez-Romero, D., Giménez, M.J., Serrano, M., García-Martínez, S., Valero, D., Valverde, J.M., Zapata, P.J., 2021. Enhancing antioxidant systems by preharvest treatments with methyl jasmonate and salicylic acid leads to maintain lemon quality during cold storage. Food Chemistry, 339, 128044.

Singha, S.P., Singh, Z., Swinny, E.E., 2009. Postharvest nitric oxide fumigation delays fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). Postharv. Biol. Technol. 53, 101–108. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.04.007

Sun, Y., Singh, Z., Tokala, V. Y., Heather, B., 2019. Harvest maturity stage and cold storage period influence lemon fruit quality. Scientia Horticulturae, 249, 322–328. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.056

Undurraga, P. L., Olaeta, J. A., Retamales, J. B., Toso, A. M., 2007. Manifestación de Peteca y pérdida de calidad en limones eureka bajo diferentes condiciones de almacenamiento refrigerado. Agrociencia, 41(2).

Valero, D., Serrano, M., 2010. Fruit ripening, Postharvest Biology and Technology For Preserving Fruit Quality, 1 ed CRC Press-Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 7-47. https://doi.org/10.1201/9781439802670

Xi, W., Lu, J., Qun, J., Jiao, B., 2017. Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. Journal of Food Science and Technology, 54, 1108–1118.

Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., Shi, J., 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. Food Chemisty, 106, 545-551. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.046

Zaharah, S.S., Singh, Z., 2011. Postharvest nitric oxide fumigation alleviates chilling injury, delays fruit ripening and maintains quality in cold-stored 'Kensington Pride' mango. Postharv. Biol. Technol. 60, 202–210.

Zhang, T., Che, F.B., Zhang, H., Pan, Y., Xu, M.Q., Ban, Q.Y., Han, Y., Rao, J.P., 2017. Effect of nitric oxide treatment on chilling injury, antioxidant enzymes and expression of the CmCBF1 and CmCBF3 genes in cold-stored Hami melon (*Cucumis melo* L.) fruit. Postharv. Biol. Technol. 127, 88–98.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Melatonina aplicada como tratamiento en campo incrementa los sistemas antioxidantes en las cerezas 'Prime Giant'

A. Carrión-Antolí[1], F. Badiche[1], J.M. Lorente-Mento[2], F. Guillén[1], S. Castillo[1], M. Serrano[2], D. Valero[1]

[1] Dept. Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel, km 3,2. 03312, Orihuela, Alicante. alberto.antoli@umh.es
[2] Dept. Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel, km 3,2. 03312, Orihuela, Alicante.

Resumen

Recientemente, se ha descrito a la melatonina como un regulador del desarrollo con efectos en retrasar la senescencia e inducir tolerancia a distintos tipos de estrés, tanto abióticos como bióticos. Además, se ha encontrado que tiene un papel importante en la maduración de los frutos y en algunas de sus propiedades de calidad. En este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de melatonina (a concentraciones 0,1, 0,3 y 0,5 mM) a cerezos (*Prunus avium* L.) de la variedad 'Prime Giant', durante el desarrollo del fruto en el árbol, sobre los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos (catalasa, ascorbato peroxidasa y peroxidasa) como no enzimáticos (fenoles y antocianinas), en las cerezas recién recolectadas y tras 21 días de conservación a 2 °C. Los resultados mostraron que los tratamientos con melatonina incrementaron significativamente la concentración de compuestos antioxidantes como antocianinas y fenoles, tanto en las cerezas recién recolectadas como durante su conservación, al igual que otros parámetros de calidad, como tamaño del fruto, firmeza y color. En general, estos efectos fueron mayores con la concentración 0,3 mM, por lo que fue en estos frutos en los que se analizaron los enzimas antioxidantes catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POD). La actividad de los enzimas CAT y APX en el momento de la recolección, fue superior en las cerezas de los árboles tratados con melatonina que en la de los árboles control y aunque en tanto en los frutos control como en los tratados disminuyeron durante la conservación, se mantuvieron a niveles más elevados en estos últimos. Así pues, se concluye que los tratamientos con melatonina incrementaron los parámetros de calidad de las cerezas y los mantuvieron durante su conservación, lo que se atribuye a un aumento de sus sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que contribuirían a una eliminación más eficaz de los radicales libres asociados con el proceso de senescencia.

Palabras clave: *Prunus avium*, fenoles, antocianinas, color, catalasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa

Melatonin applied as a field treatment increases antioxidant systems in 'Prime Giant' cherries

Abstract

Recently, melatonin has been described as a developmental regulator with effects on delaying senescence and inducing tolerance to different types of stress, both abiotic and biotic. In addition, it has been reported to play an important role in fruit ripening and in some of their quality properties. In this work, the effects of the application of melatonin (at concentrations 0.1, 0.3 and 0.5 mM) to cherry trees (*Prunus avium* L.) cv. 'Prime Giant', during the development of the fruit in the tree, on the antioxidant systems, both enzymatic (catalase, ascorbate peroxidase and peroxidase) and non-enzymatic (phenols and anthocyanins), were evaluated after 0 and 21 days of storage at 2 °C. Results showed that melatonin treatments significantly increased the concentration of antioxidant compounds, such as anthocyanins and phenols, both in freshly harvested cherries and during storage, as well as other quality parameters, such as fruit size, firmness and color. In general, these effects were greater with the 0.3 mM concentration, so it was in these fruits that the antioxidant enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POD) were analyzed. The activity of the CAT and APX enzymes at the time of harvest was higher in the cherries of melatonin trees treated than in those of control trees. In fruits from control and treated trees CAT and APX activities decreased during storage, but they remained at higher levels in

the latter. Thus, it is concluded that the melatonin treatments increased the quality parameters of sweet cherries and maintained them during storage, which is attributed to an increase in the antioxidant systems, both enzymatic and non-enzymatic, contributing to a more efficient elimination of free radicals associated with the senescence process.

Keywords: Prunus avium, phenols, anthocyanins, color, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase

Introducción

Las cerezas son los frutos de la especie *Prunus avium*, estos frutos son muy apreciados por los consumidores debido a la gran cantidad de nutrientes y compuestos bioactivos que contienen, entre los que destacan las antocianinas y los polifenoles (McCune et al., 2010). Las cerezas son frutos que se deterioran rápidamente tras la recolección, por lo que es importante realizar un adecuado manejo pre y post-cosecha para mantener la calidad de la fruta durante su vida comercial.

La melatonina es una hormona que está implicada en el crecimiento y desarrollo de las plantas, además interviene en la respuesta a distintos tipos de estrés tanto bióticos como abióticos. La aplicación exógena de esta hormona en plantas ha mejorado la producción, el peso de los frutos, la composición y por lo tanto su calidad (Wang et al., 2020). Se han realizado ensayos en cerezas con elicitores similares entre los que destacan el ácido oxálico y el salicilato de metilo, en los que la aplicación precosecha ha conseguido aumentar el contenido de compuestos antioxidantes, entre los que destacan las antocianinas y polifenoles, estos tratamientos también han conseguido potenciar la actividad de los enzimas antioxidantes (Valverde et al., 2015; Martínez-Esplá et al., 2014).

El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de la aplicación exógena de melatonina sobre los sistemas antioxidantes de la cereza, con la finalidad de aumentarlos en el momento de la recolección y mantenerlos en condiciones de refrigeración, de manera que el consumidor final pueda disfrutar de una fruta de calidad con un alto contenido en compuestos bioactivos.

Material y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

Este ensayo se ha llevado a cabo en la finca comercial “Finca Toli” ubicada en Jumilla (Murcia), la variedad empleada fue ‘Prime Giant’, se trata de una cereza de gran calibre, buen sabor y maduración temprana.

El diseño experimental estaba formado por tres réplicas de tres árboles, dando lugar a un total de 9 árboles por bloque, el diseño constaba de 4 bloques sobre los que se realizaron los distintos tratamientos. Se ensayaron tres concentraciones de melatonina 0,1 mM, 0,3 mM y 0,5 mM, las aplicaciones se realizaron en tres estados fenológicos concretos: endurecimiento de hueso, cambio de color y tres días antes de la recolección. Los tratamientos se realizaron mediante pulverización foliar, aplicando un volumen de 2 litros por árbol, en el caso del control la aplicación se realizó con agua solo.

Las cerezas se recolectaron en el punto de madurez comercial, una vez cosechadas se transportaron al laboratorio para realizar las determinaciones correspondientes al día cero y también se prepararon los lotes de conservación. De cada replica de tres árboles, se cogió una muestra representativa de 20 cerezas para preparar cada uno de los lotes, dando lugar a 60 cerezas por tratamiento, esta operación se repitió para preparar también los lotes de conservación, los cuales se muestrearon a los 21 días tras la recolección, estas cerezas se almacenaron en condiciones de refrigeración a 2ºC.

Cuantificación de polifenoles y antocianinas totales

Los polifenoles totales se determinaron según la metodología propuesta por Valverde et al. (2015), se utilizaron 5 gramos de tejido congelado, a los que se añadieron 10 mL de una mezcla de metanol:agua (8:2, v/v) para realizar la extracción, para determinar el contenido de polifenoles se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu.

Las antocianinas totales se cuantificaron a partir de 2 gramos de tejido congelado que se homogeneizaron con 10 mL de una mezcla de metanol:agua (8:2, v/v), a la que se le añadió un 1% de HCl para conservar las antocianinas. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro a 530 nm (Valverde et al., 2015).

Enzimas antioxidantes

Catalasa, peroxidasa y ascorbato peroxidasa se midieron a partir de 5 gramos de tejido congelado que se homogeneizaron con 10 mL de tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 7,2, con 1% de polivinilpirrolidona y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (Zapata et al., 2014).

Para cuantificar la peroxidasa la mezcla de reacción contenía tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 7,2, 12 mM H_2O_2, 7 mM guayacol y 200 µl de extracto enzimático para un volumen final de 3 mL. La actividad peroxidasa se midió como el incremento de absorbancia a 470 nm durante 2 minutos y se expresó como U $min^{-1}g^{-1}$, donde una unidad de actividad enzimática (U) se define como el incremento de 0,01 unidades de absorbancia por minuto.

Para cuantificar la enzima ascorbato peroxidasa la mezcla de reacción contenía tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 7,2, 1 mM H_2O_2, 0,5 mM ácido ascórbico y 200 µl de extracto enzimático para un volumen final de 3 mL. Se midió el descenso de absorbancia a 290 nm durante 60 segundos y se expresó como U $min^{-1}g^{-1}$, donde una unidad de actividad enzimática (U) se define como el descenso de 0,01 unidades de absorbancia por minuto.

Para cuantificar la enzima catalasa la mezcla de reacción contenía tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 7,2, 15 mM H_2O_2 y 200 µl de extracto enzimático para un volumen final de 3 mL. Se midió el descenso de absorbancia a 240 nm durante 60 segundos y se expresó como U $min^{-1}g^{-1}$, donde una unidad de actividad enzimática (U) se define como el descenso de 0,01 unidades de absorbancia por minuto.

Análisis estadístico

El estudio estadístico se hizo con el software SPSS paquete v. 12.0 para Windows. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para un $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

Según se observa en la Tabla 1, el día de la recolección el contenido en polifenoles totales es superior en las cerezas tratadas que en el control, además durante los 21 días de conservación el contenido de polifenoles aumenta en los tratamientos y en el control, comportamiento que se ha descrito en otros estudios (Serrano et al., 2009). La dosis de melatonina 0,5 mM es la que presenta un mayor contenido de polifenoles totales en el momento de la recolección, pero sin embargo tras los 21 días de conservación la dosis de melatonina 0,3 mM es la que tiene un valor superior, presentando diferencias significativas con el resto de tratamientos.

Las antocianinas tienen un comportamiento similar al de los polifenoles el día de la recolección, esto se debe a que las antocianinas son los compuestos fenólicos mayoritarios en la cereza (Díaz-Mula et al., 2009). En la cosecha todos los tratamientos tienen un valor superior al control, pero es la dosis de

melatonina 0,5 mM la que presenta un valor mayor de 89,64 mg 100 g^{-1}, respecto a los 49,20 mg 100 g^{-1} del control. Tras 21 días de conservación el contenido de antocianinas fue superior en todos los tratamientos respecto al control, siendo estas diferencias significativas (Tabla 1).

La concentración de melatonina 0,3 mM se ha seleccionado para realizar un estudio posterior de enzimas antioxidantes, ya que es la dosis que tiene un mejor comportamiento tras los 21 días de conservación, debido a que presenta los mejores niveles de antocianinas y polifenoles respecto al control.

Tabla 1. Contenido de antocianinas y polifenoles totales (mg 100 g^{-1}) en cerezas de la variedad 'Prime Giant' tratadas con melatonina (0,1, 0,3 y 0,5 mM), en el día de la recolección y tras 21 días de conservación a 2 ºC. [a]

	Tratamiento	Día 0	Día 21
Polifenoles	Control	80,06 ± 3,84 b	94,94 ± 2,37 b
	Melatonina 0,1 mM	83,96 ± 2,99 b	98,58 ± 2,21 b
	Melatonina 0,3 mM	88,56 ± 4,07 ab	106,98 ± 1,56 a
	Melatonina 0,5 mM	100,48 ± 3,67 a	99,61 ± 0,37 b
Antocianinas	Control	49,20 ± 1,45 c	55,24 ± 0,92 b
	Melatonina 0,1 mM	64,74 ± 2,90 b	65,89 ± 2,50 a
	Melatonina 0,3 mM	62,23 ± 1,34 b	75,35 ± 5,47 a
	Melatonina 0,5 mM	89,64 ± 3,80 a	70,90 ± 2,94 a

[a] Los datos son la media ± ES. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos para $p < 0,05$.

Estímulos abióticos y bióticos ocasionan en las células vegetales la activación de diversas rutas metabólicas, cuando estos factores ocasionan una situación de estrés celular, una respuesta común es la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), algunas de estas moléculas son el ion superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. La acumulación de ROS en la célula vegetal ocasiona daño oxidativo, senescencia y si los niveles son altos incluso la muerte celular, debido a este motivo las células han desarrollado diversas estrategias para mantener las especies reactivas del oxígeno en niveles adecuados, una de ellas es la síntesis de compuestos y enzimas antioxidantes (Bhattacharjee, 2012).

Tabla 2. Actividad catalasa, ascorbato peroxidasa y peroxidasa (U $min^{-1}g^{-1}$) para el control y el tratamiento de melatonina 0,3 mM sobre la variedad 'Prime Giant', en el día de la recolección y tras tres semanas de conservación a 2 ºC.[a]

		Control	Melatonina 0,3 mM
Catalasa	Día 0	135,08 ± 9,64 b	205,93 ± 6,11 a
	Día 21	116,37 ± 6,15 b	151,19 ± 12,28 a
Ascorbato peroxidasa	Día 0	118,08 ± 4,14 b	139,21 ± 4,32 a
	Día 21	107,28 ± 6,15 b	125,19 ± 4,38 a
Peroxidasa	Día 0	51,96 ± 1,02 a	49,68 ± 2,71 a
	Día 21	76,07 ± 1,80 a	70,06 ± 1,98 a

[a] Los datos son la media ± ES. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos para $p < 0,05$.

En este ensayo se han evaluado los niveles de las enzimas antioxidantes catalasa, ascorbato peroxidasa y peroxidasa, durante el día de la recolección y tras tres semanas en refrigeración a 2ºC (Tabla 2). La actividad catalasa del tratamiento con melatonina 0,3 mM es significativamente mayor al control,

concretamente un 52,4 % el día de la recolección, durante el periodo de conservación la actividad catalasa disminuyó en el tratamiento y en el control, pero incluso al final de la conservación esta enzima tiene un valor superior al control, presentando diferencias significativas.

La actividad ascorbato peroxidasa en el momento de la cosecha fue un 17,9 % superior en el tratamiento que en el control. Durante la conservación el nivel de la actividad ascorbato peroxidasa disminuyo en el tratamiento y en el control, pero el tratamiento de melatonina 0,3 mM mantuvo niveles superiores al control.

La reducción de la actividad catalasa y peroxidasa durante la conservación de la cereza también se ha observado en otras variedades, en este caso la aplicación de tratamientos con salicilato de metilo consiguió aumentar los niveles de las enzimas antioxidantes, tanto el día de la recolección como durante la conservación (Valverde et al., 2015). Otros sistemas físicos como el *vacuum-cooling* también permiten incrementar la actividad de las enzimas antioxidantes durante la conservación, además de disminuir el contenido de malondialdehído, manteniendo de esta manera la frescura de la cereza durante más tiempo (He et al., 2013).

Respecto a la actividad peroxidasa no hay diferencias significativas el día de la cosecha entre el tratamiento y el control. Según se aprecia en la Tabla 2 la actividad de esta enzima aumenta durante el periodo de conservación en ambas muestras, Yao y Tian (2005) también reportaron un aumento de los niveles de la actividad peroxidasa durante la conservación postcosecha de cerezas control y tratadas con ácido salicílico y metil jasmonato.

Conclusiones

La aplicación precosecha de melatonina en cerezos consiguió incrementar los parámetros de calidad de la fruta en el momento de la recolección y durante su conservación. Sobre todo, durante la conservación se incrementó el contenido de compuestos bioactivos de las cerezas tratadas con melatonina respecto al control, destacando el incremento de fenoles y antocianinas. La dosis que mejor comportamiento tuvo fue la de melatonina 0,3 mM, ya que los niveles de compuestos bioactivos se mantuvieron más estables tras los 21 días de conservación. La actividad de los enzimas antioxidantes catalasa y ascorbato peroxidasa fue superior en las cerezas tratadas con melatonina que en el control, aunque tanto en el tratamiento como en el control disminuyeron los niveles de estas enzimas durante la conservación, pero en las cerezas tratadas estos valores fueron más altos. Por lo tanto, se puede concluir que los tratamientos con melatonina, aumentan los sistemas antioxidantes de la cereza tanto enzimáticos como no enzimáticos, esto permite a las células reducir más efectivamente las especies reactivas del oxígeno, lo que se traduce en un retraso de la senescencia del fruto y aumento de la vida útil.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por medio de una subvención para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) y por el proyecto RTI2018-099664-B-I00. También agradecemos a la empresa “Finca Toli” la ayuda técnica y cesión temporal de las instalaciones para realizar el ensayo.

Bibliografía

Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. Journal of Botany, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/985298

Díaz-Mula, H. M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P. J., Guillén, F., & Serrano, M. (2009). Sensory, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. Food Science and Technology International, 15(6), 535-543. https://doi.org/10.1177/1082013209351868

He, S. Y., Zhang, G. C., Yu, Y. Q., Li, R. G., & Yang, Q. R. (2013). Effects of vacuum cooling on the enzymatic antioxidant system of cherry and inhibition of surface-borne pathogens. International Journal of Refrigeration, 36(8), 2387-2394. https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2013.05.018

Martínez-Esplá, A., Zapata, P. J., Valero, D., García-Viguera, C., Castillo, S., & Serrano, M. (2014). Preharvest application of oxalic acid increased fruit size, bioactive compounds, and antioxidant capacity in sweet cherry cultivars (Prunus avium L.). Journal of agricultural and food chemistry, 62(15), 3432-3437. https://doi.org/10.1021/jf500224g

McCune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N. R., & Thomson, C. A. (2010). Cherries and health: a review. Critical reviews in food science and nutrition, 51(1), 1-12. https://doi.org/10.1080/10408390903001719

Serrano, M., Diaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martinez-Romero, D., ... & Valero, D. (2009). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(8), 3240-3246. https://doi.org/10.1021/jf803949k

Valverde, J. M., Giménez, M. J., Guillén, F., Valero, D., Martínez-Romero, D., & Serrano, M. (2015). Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees increase antioxidant systems in fruit at harvest and during storage. Postharvest Biology and Technology, 109, 106-113. http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.06.011

Wang, S. Y., Shi, X. C., Wang, R., Wang, H. L., Liu, F., & Laborda, P. (2020). Melatonin in fruit production and postharvest preservation: A review. Food chemistry, 320, 126642. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126642

Yao, H., & Tian, S. (2005). Effects of pre-and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. Postharvest Biology and Technology, 35(3), 253-262. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.09.001

Zapata, P. J., Martínez-Esplá, A., Guillén, F., Díaz-Mula, H. M., Martínez-Romero, D., Serrano, M., & Valero, D. (2014). Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. Postharvest Biology and Technology, 98, 115-122. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.012

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Estudio del contenido en polifenoles de cuatro variedades de alcachofa (*Cynara scolymus L.*): aptitud para cuarta gama

M. Giménez-Berenguer [1], M. J. Giménez [1], P. Carbonell [2], J. A. Cabrera [2] y P. J. Zapata [1]

[1] Dept. Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel Km 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, España. e-mail: marina.gimenez02@goumh.umh.es
[2] Dept. Biología Aplicada, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel Km 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, España.

Resumen

La alcachofa es una hortaliza originaria de la región mediterránea, siendo en esta zona donde mayoritariamente se localiza su producción. En los últimos años su consumo se ha extendido por todo el mundo, siendo muy apreciada por su alto contenido en compuestos bioactivos, mayoritariamente fenoles del grupo de los ácidos hidroxicinámicos y flavonoides como la luteolina. El elevado contenido en polifenoles de los capítulos de alcachofa produce un mayor pardeamiento durante su procesado para su uso en cuarta gama, lo que dificulta su utilización en la industria. En trabajos previos se han encontrado importantes diferencias del contenido en polifenoles en distintas variedades de alcachofa, así como en función del tipo de capítulos (principales o guías, secundarios o segundos y terciarios o terceros, según su orden de desarrollo). En este trabajo se ha estudiado el contenido en polifenoles de los capítulos tras la recolección comercial de las variedades de alcachofa Blanca de Tudela (reproducción vegetativa), Lorca y Tupac (de semilla de polinización abierta), y Green Queen (de semilla híbrida). Las cuatro variedades fueron cultivadas en una parcela experimental de la EPSO-UMH, entre los meses de agosto de 2020 y abril de 2021, siguiendo las prácticas habituales de la zona. Entre los factores estudiados, la variedad de alcachofa ha explicado el 13,88% de la variabilidad, el tipo de capítulo el 11,64% y el estado interno el 32,33%. Los resultados de este trabajo han mostrado diferencias varietales en el contenido fenólico, y como afectan al mismo la posición del capítulo en la planta y el estado de desarrollo del capítulo, sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar los resultados obtenidos.

Palabras clave: capítulo floral, compuestos bioactivos, pardeamiento, alcachofa mínimamente procesada

Study of the polyphenol content of four varieties of artichoke (*Cynara scolymus L.*): aptitude for fourth range

Abstract

The artichoke is a vegetable native to the Mediterranean region, being this area where its production is mostly located. In recent years its consumption has spread throughout the world, being highly appreciated for its high content of bioactive compounds, mainly phenols from the group of hydroxycinnamics and flavonoids such as luteolin. The high polyphenol content of artichoke strains produces a greater browning during processing and use in the fourth range, which makes its use in industry difficult. In previous works, important differences have been found in the polyphenol content of different varieties of artichoke, as well as between the type of flower heads (main or guides, secondary or second and tertiary or third, according to their development order). In this work, the polyphenol content of the heads after commercial harvesting of the artichoke varieties Blanca de Tudela (vegetative reproduction), Lorca and Tupac (open-pollinated seed), and Green Queen (hybrid seed) have been studied. The four varieties were grown in an EPSO-UMH experimental field, between the months of August 2020 and April 2021, following the usual practices of the area. Among the factors studied, the variety has explained 13.88% of the variability, the type of head 11.64% and the inner state 32.33%. The results of this work have shown varietal differences in phenolic content, and how it is affected by the head position in the plant and by their stage of development, however, more studies are necessary to confirm the results obtained.

Keywords: flower head, bioactive compounds, browning, minimally processed artichoke

Introducción

La alcachofa *(Cynara cardunculus L. var. scolymus* (L.) Fiori) es una hortaliza originaria de la región mediterránea y su producción y consumo se ha extendido por todo el mundo en los últimos años. Esta verdura es consumida debido a su sabor, y su ingesta proporciona beneficios para la salud y el bienestar humano (Pandino et al., 2011). La alcachofa es una fuente rica en compuestos antioxidantes y contiene altas cantidades de compuestos fenólicos totales (Brat et al., 2006) siendo los mayoritarios los fenoles del grupo de los ácidos hidroxicinámicos y flavonoides como la luteolina. (Jun et al., 2007; Lazzantio et al., 2009; Martínez-Esplá et al., 2017; Pinelli et al., 2007; Schütz et al., 2004). La presencia de estos compuestos en la dieta humana está relacionada con un efecto protector frente a determinadas enfermedades crónicas y degenerativas relacionadas con el estrés oxidativo (Ceccarelli et al., 2010; Falco et al., 2015). Los polifenoles son capaces de reducir niveles anormalmente altos de especies reactivas de oxígeno que se encuentran en una amplia gama de trastornos, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer (Jiménez et al., 2016; Vázquez-Olivo et al., 2019). Asimismo, España se sitúa entre los 3 mayores países productores mundiales de alcachofa, solamente superado por Italia y Egipto (FAOSTAT, 2019). Es por ello por lo que tiene una alta importancia económica en nuestro país, sobre todo en las regiones de la Comunidad Valenciana y Murcia, donde se produce aproximadamente el 80% de la producción nacional.

La parte comestible de la alcachofa es la inflorescencia inmadura llamada 'cabeza o capítulo', y su forma, tamaño y color difieren según la variedad (Lombardo et al., 2010). Por otro lado, el perfil cuantitativo y cualitativo de fenoles se ve influenciado por diversos factores tales como el tiempo de cosecha, el manejo agronómico, las condiciones ambientales y postcosecha, la parte de la planta y la variedad, entre otros (Ceccarelli et al., 2010; Lombardo et al., 2009; Pandino et al., 2013).

La caracterización y cuantificación de estos compuestos bioactivos en cultivares comerciales y locales, podría permitir seleccionar variedades de alcachofa en función de su perfil fenólico. De hecho, esta información parece ser útil para definir la idoneidad de las diferentes variedades para el consumo en fresco y / o procesado industrial, ya que los polifenoles tienen un papel importante tanto desde el punto de vista nutracéutico como tecnológico (Lombardo et al., 2010). Un elevado contenido en fenoles mantiene determinados atributos de calidad de las alcachofas durante su vida útil postcosecha, por lo que las alcachofas/variedades que presenten un mayor contenido de compuestos bioactivos tendrán una mayor aptitud para su comercialización en fresco (Lattanzio et al., 1994). Sin embargo, las concentraciones altas de polifenoles en los capítulos de alcachofa producen un mayor pardeamiento tras su procesado, lo que dificulta su utilización en cuarta gama (Ruíz-Jiménez et al., 2014).

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es realizar una caracterización físico-química y funcional estudiando el contenido en polifenoles de los capítulos (principales, secundarios y terciarios) tras la recolección comercial de las variedades de alcachofa Blanca de Tudela, Lorca, Tupac y Green Queen. Con este trabajo se pretenden identificar las alcachofas con mejores aptitudes, bien para la comercialización en fresco o para la industria de cuarta gama.

Material y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo con variedades de alcachofa “Blanca de Tudela”, “Lorca”, “Tupac” y “Green Queen” a lo largo del ciclo de desarrollo desde agosto del 2020 hasta abril de 2021, en una parcela experimental de la Universidad Miguel Hernández (Orihuela, Alicante) en condiciones climáticas mediterráneas y prácticas agronómicas convencionales.

Se sembraron plantas de las variedades Blanca de Tudela (de reproducción por esquejes) de las cuales solamente 12 consiguieron crecer debido a las marras de brotación, 36 plantas de la variedad Lorca (de reproducción por semillas y de polinización abierta) y, debido a problemas en la realización de la planta en semillero, 14 de Tupac (de reproducción por semillas y de polinización abierta). Por último, y en función de la disponibilidad, se cultivaron 16 plantas de la variedad Green Queen (reproducción híbrida).

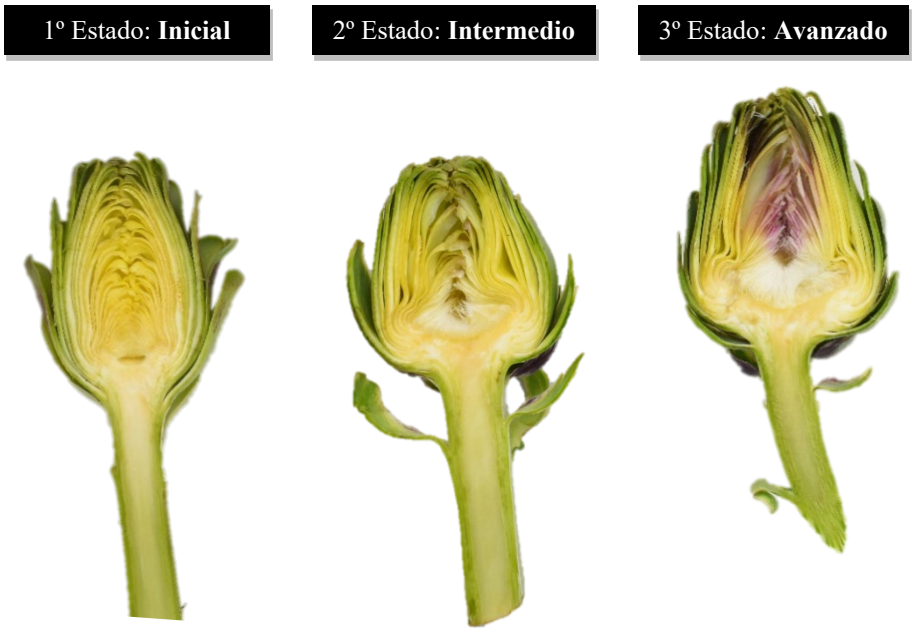
La plantación de las alcachofas de primer año tuvo lugar a mediados de agosto y se realizó siguiendo un marco de plantación 0,8 x 1,2 m., utilizando las prácticas de cosecha habituales de la zona. Finalmente, las alcachofas se recolectaron en la etapa de desarrollo comercial según el tamaño de la cabeza y la morfología cuando están firmes, bien cerradas y listas para consumir. El primer corte de alcachofa se realizó el día 1 de febrero de 2021 y se fueron recolectando semanalmente, obteniendo así 13 fechas/días de corte distintas, siendo la última el día 21 de abril de 2021. Se cosecharon un total de 899 alcachofas, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Número y tipo de capítulos recolectados de cada variedad de alcachofa.

Tipo de capítulo	Blanca de Tudela	Lorca	Tupac	Green Queen
Guías	14	40	14	16
Segundas	74	278	65	73
Terceras	33	127	38	127
TOTAL	**121**	**445**	**117**	**216**
		899		

Para cada fecha de corte se registró la variedad, así como el orden del capítulo de alcachofa (principal o guía, secundario y terciario). Posteriormente, se trasladaron al laboratorio donde se realizó una valoración del desarrollo del estado interno empleando una escala de tres niveles, siendo 1= estado inicial (alcachofas sin pelo interno o con escaso pelo, corazones verdes y tiernos), 2= desarrollo intermedio (alcachofas con una cantidad de pelo interno intermedia, pero aun conservando los corazones verdes) y 3= desarrollo avanzado (alcachofas con elevada cantidad de pelo interno e incluso pudiéndose apreciar un cambio de color verde a morado en el corazón de la alcachofa).

Figura 1. Escala de desarrollo del estado interno.



Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos totales

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se utilizó el protocolo descrito y adaptado a alcachofa de Martínez-Esplá et al. (2017). En la fase de extracción de los compuestos, se homogenizaron 5g de muestra de la parte comestible de cada alcachofa (corazón y brácteas internas) con 15 mL de agua/metanol (20:80) conteniendo Fluoruro sódico (NaF) 2 mM (para inactivar la actividad polifenol

oxidasa y evitar la degradación fenólica) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los compuestos fenólicos totales se midieron por duplicado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu y la concentración se expresó como miligramos de ácido gálico equivalente por 100 g de peso fresco.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de los componentes de la varianza con todos los valores de contenido en polifenoles. Los datos para las determinaciones analíticas se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), siendo las variables dependientes el contenido polifenólico total y los factores de estudio la variedad de alcachofa (Blanca de Tudela, Lorca, Tupac o Green Queen), el tipo u orden de capítulo (guías, segundas o terceras) y el estado interno.

Las comparaciones de medias se realizaron utilizando la prueba de LSD para determinar las diferencias significativas con un p <0,05. Todos los análisis se realizaron con el paquete de software STATGRAPHICS Plus, versión 3.1 para Windows.

Resultados y Discusión

Al realizar el análisis de los componentes de la varianza con todos los resultados, un total de 899 capítulos de alcachofa (Tabla 2), se obtiene que el porcentaje que tiene representativo cada una de las variables estudiadas da como resultado para la variedad un 13,88%, para el tipo de capítulo un 11,64% y para el estado interno un 32,33%, quedando representado así con un error del 42,15%.

Tabla 2. Análisis general de componentes de varianza para polifenoles.

Fuente	Media cuadrática	Análisis de la varianza	Porcentaje
Variedad	320665,0	1500,15	13,88
Tipo	16305,3	1257,49	11,64
Estado interno	9883,58	3494,59	32,33
ERROR	4555,48	4555,48	42,15

Al efectuar el análisis general de la varianza con las variables mencionadas anteriormente (Tabla 3), los resultados mostraron que, por separado, tanto la variedad como el tipo y el estado interno fueron factores significativos, siendo este último el que menor significancia obtuvo al presentar un valor de F igual a 2,41. Sin embargo, cuando se realizó el análisis teniendo en cuenta las interacciones entre variables, se estableció que la relación entre la variedad y el tipo también fueron significativas, así como la interacción entre el tipo y el estado interno. En cambio, los resultados para la interacción entre la variedad y el estado interno no presentaron diferencias significativas.

Tabla 3. Análisis general de varianza para polifenoles con las interacciones.

Fuente	Media cuadrática	F-Ratio	P-Value
Efectos Principales			
A: Variedad	208461,0	25,93	0,0000
B: Tipo	188543,0	23,46	0,0000
C: Estado interno	19337,0	2,41	0,0908
Interacciones			
AB: Variedad x Tipo	20602,8	2,56	0,0182
AC: Variedad x Estado interno	12486,9	1,55	0,1578
BC: Tipo x Estado interno	27452,9	3,42	0,0088
Residual	8038 ,17		

Todos los F-Ratio se basan en el error cuadrático medio residual.

Al analizar la influencia del tipo capítulo para cada una de las variedades ensayadas se observaron diferentes resultados según la variedad analizada (Figura 2).

Para la variedad Blanca de Tudela no se observaron diferencias significativas en el contenido fenólico entre las alcachofas guías, segundas y terceras. Para la variedad Green Queen sí se observaron diferencias significativas entre los distintos tipos, siendo las terceras las que presentaron una mayor concentración de fenoles totales.

Con respecto a la variedad de alcachofa, la variedad Lorca fue la que mayor diferencia significativa presentó entre los tres tipos de capítulos florales, siendo las alcachofas terceras las que mayor concentración de fenoles presentaron, seguidas de las segundas, y fueron las guías las que menor contenido mostraron.

Finalmente, para la variedad Tupac, también se observaron diferencias significativas entre los 3 órdenes de cabezas; sin embargo, los resultados mostraron una tendencia diferente en el contenido fenólico entre los 3 capítulos. Las alcachofas que presentaron mayor contenido fenólico fueron las terceras, seguidas por las guías, siendo las segundas las que contenían menor concentración.

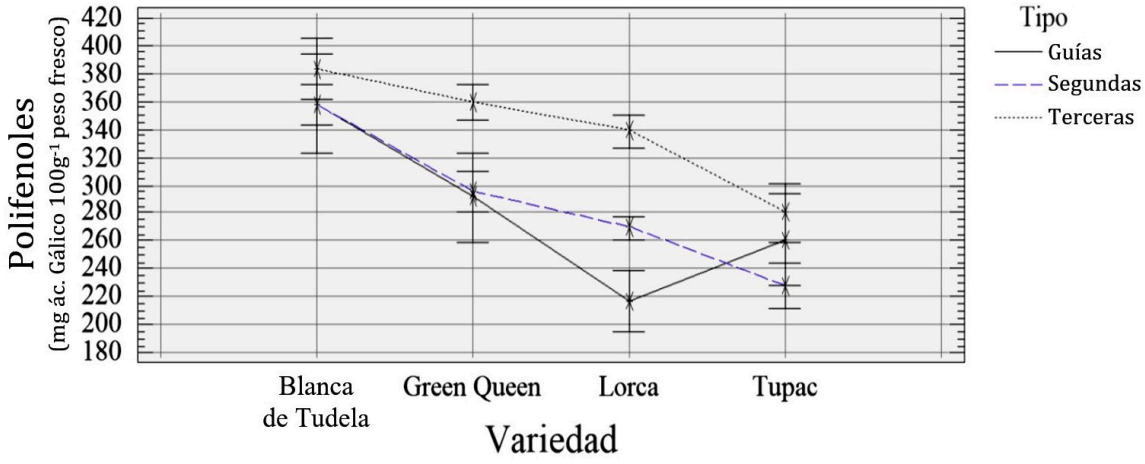


Figura 2. Interacción entre la variedad y el tipo de capítulo.

La figura 3 representa la interacción entre la variedad y el estado interno. Para las variedades Blanca de Tudela y Green Queen, no se encontraron diferencias significativas en lo que respecta a la interacción de estos dos factores entre sí.

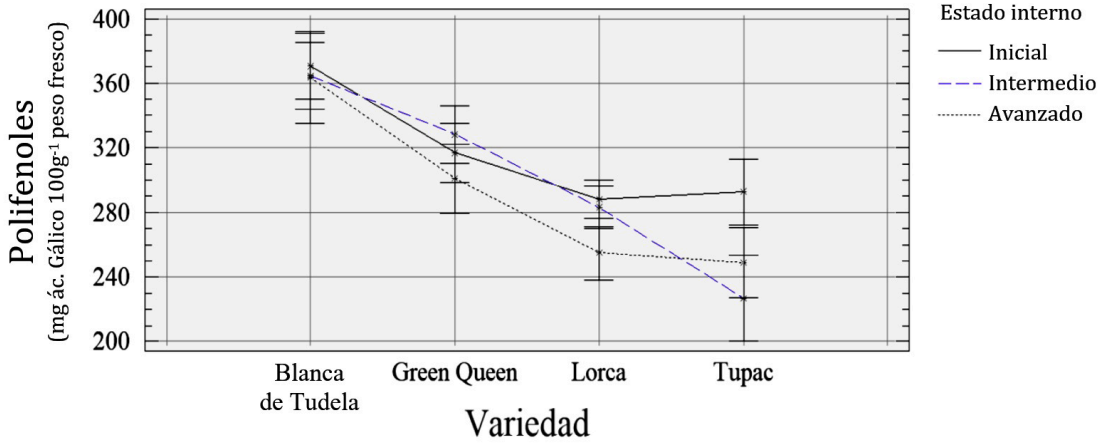


Figura 3. Interacción entre la variedad y el estado interno.

Por el contrario, en la variedad Lorca, el contenido polifenólico fue menor cuanto más avanzado era el estado de desarrollo (estado 3), encontrándose una mayor concentración de estos compuestos bioactivos cuando las alcachofas estaban en un estado de desarrollo inicial (estado 1) o intermedio (estado 2). En cambio, para la variedad Tupac, sólo se observó este aumento en los fenoles totales cuando las alcachofas se encontraban en un estado de desarrollo temprano (estado 1).

En cuanto a la interacción entre el tipo y el estado interno (Figura 4), de forma general, las alcachofas guías presentaron mayor concentración fenólica cuando su desarrollo interno estaba en un estado más avanzado (estado 3), mientras que, en las alcachofas de segundo y tercer orden, el contenido polifenólico fue mayor cuando su desarrollo interno era más temprano (estados 1 y 2).

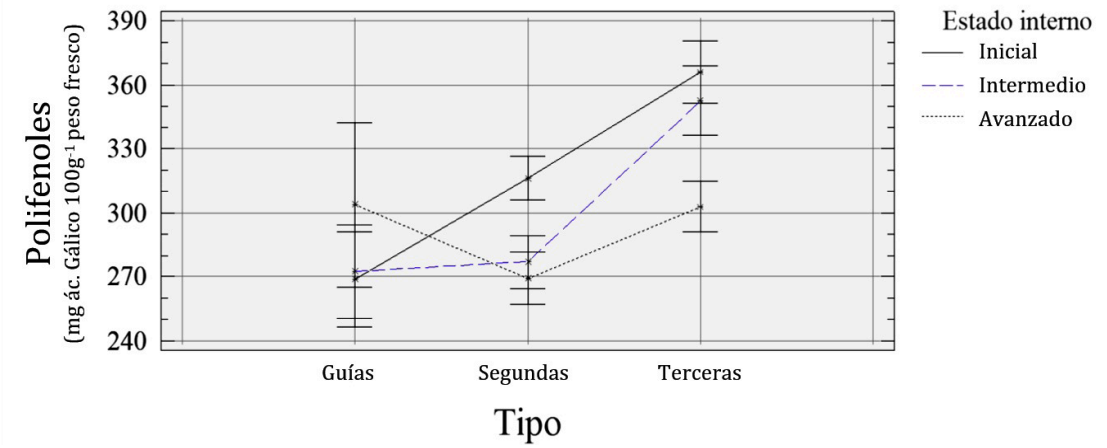


Figura 4. Interacción entre el tipo de capítulo y su estado interno.

Tabla 4. Análisis general de varianza para polifenoles con las interacciones por variedades.

	BLANCA DE TUDELA			LORCA		
Fuente	**Media cuadrática**	**F-Ratio**	***P*-Value**	**Media cuadrática**	**F-Ratio**	**P-Value**
Efectos Principales						
A: Tipo	2509,9	0,20	0,8179	221520,0	34,51	0,0000
B: Estado interno	2315,3	0,19	0,8307	15526,3	2,42	0,0902
Interacciones						
AB: Tipo x Estado interno	13945,5	1,12	0,3513	12465,6	1,94	0,1025
Residual	12465,5			6419,27		
	TUPAC			**GREEN QUEEN**		
Efectos Principales						
A: Tipo	26159,1	3,76	0,0263	87264,1	9,40	0,0001
B: Estado interno	40328,3	5,8	0,0041	5634,7	0,61	0,5459
Interacciones						
AB: Tipo x Estado interno	476,464	0,07	0,9913	42150,3	4,54	0,0015
Residual	6954,24			9280,5		

Todos los F-Ratio se basan en el error cuadrático medio residual.

Al analizar los resultados obtenidos para cada variedad de alcachofa por separado (Tabla 4), para la variedad Blanca de Tudela, no se observaron diferencias significativas para ninguna de las variables tipo o estado interno, ni se apreciaron diferencias en la interacción de ambas variables.

Para la variedad Lorca se observaron diferencias significativas en cuanto al tipo de capítulo siendo mayor el contenido en fenoles totales en las alcachofas de tercer orden, seguidas de las segundas y por

último las guías. Con respecto al estado interno, se encontraron menores diferencias que en cuanto al tipo, siendo el contenido polifenólico superior en alcachofas con un estado de desarrollo inicial (estado 1) e intermedio (estado 2). Por el contrario, no se apreciaron diferencias significativas entre la interacción de ambos factores.

Del mismo modo, para la variedad Tupac se encontraron diferencias significativas para el tipo (mayor concentración fenólica total en alcachofas, terceras, guías y segundas en ese orden) y el estado interno (mayor concentración fenólica cuando menos desarrollado el estado interno de la alcachofa), pero no para la interacción entre ambos.

Finalmente, para la variedad Green Queen, no se observaron diferencias significativas para el estado de desarrollo interno, pero sí para el tipo u orden de capítulo, obteniendo un contenido fenólico mayor en las alcachofas terceras que en las guías y segundas. Asimismo, también aparecieron diferencias significativas al analizar la interacción entre el tipo y el estado interno (Figura 5). Para las alcachofas guías, la concentración de fenoles fue mayor cuanto mayor era el estado de desarrollo (estado 3). En cambio, para las alcachofas de tercer orden se observó una tendencia inversa, ya que la concentración fenólica en alcachofas con un estado interno inicial e intermedio (estados 1 y 2) fue superior que en alcachofas donde el estado de desarrollo se presentaba más avanzado (estado 3). Esto puede deberse a que se recolectaron solamente 16 alcachofas guías (Tabla 1), una por planta, siendo un tamaño muestral reducido para conseguir una homogeneidad total en los datos.

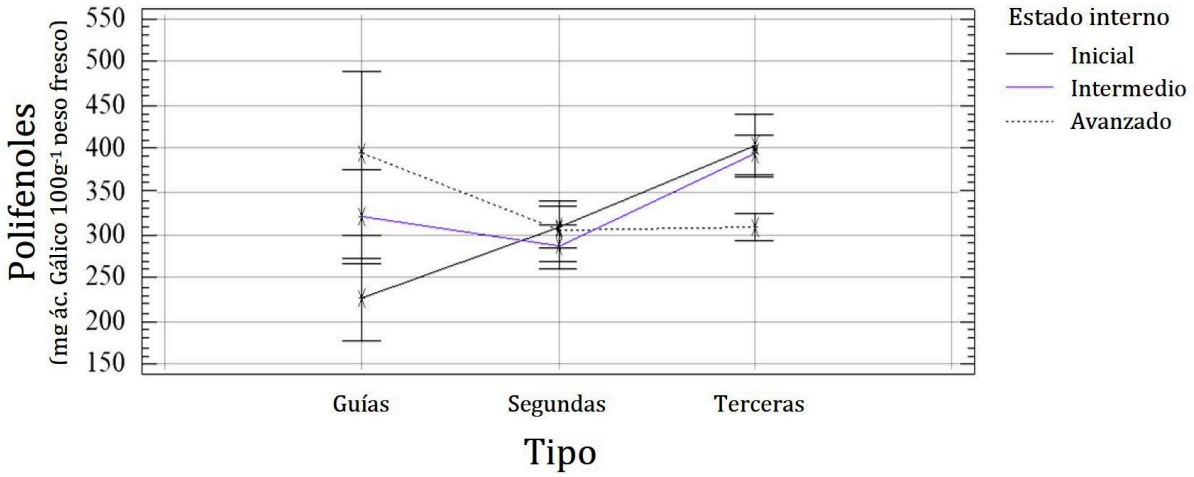


Figura 5. Interacción entre el tipo y el estado interno alcachofas variedad Green Queen.

Diferentes estudios han demostrado que el contenido polifenólico es mayor en alcachofas de tercer y segundo orden que en alcachofas guía (Cappelletti et al., 2016; Gagliardi et al., 2020; Giménez et al., 2020; 2021) en diferentes variedades, incluidas Blanca de Tudela, Lorca y Tupac.

Concretamente, en la variedad Blanca de Tudela se ha observado que los capítulos terciarios tenían niveles significativamente más altos de compuestos fenólicos que los secundarios y principales, y estos capítulos principales mostraron niveles significativamente menores que los secundarios (Giménez et al., 2020; 2021). No obstante, esos resultados difieren a los obtenidos en este estudio. Estas diferencias pueden estar relacionadas con fallos de marra de la planta y a que el número de alcachofas totales analizadas de esta variedad ha sido insuficiente para obtener unos resultados concluyentes. Del mismo modo, en la variedad Green Queen, al ser de germinación por semillas hibridas, solamente produjeron una única alcachofa guía, por lo que solo se analizaron 16 alcachofas de este tipo (Tabla 1), tantas como plantas disponibles.

Con respecto a la variedad Tupac, las alcachofas terciarias fueron las que mayor concentración fenólica contenían, seguidas de las guías, siendo los capítulos secundarios las que menor contenido polifenólico mostraron. Sin embargo, en otros trabajos mostraron mayor contenido fenólico en los capítulos terciarios, secundarios y guías, respectivamente (Giménez et al., 2021). Cabe señalar que esta

variabilidad podría estar relacionada con el estado inicial no óptimo de las plántulas de Tupac, disponiendo solo de 14 guías para su análisis (Tabla 1).

Por otro lado, para la variedad Lorca se tomaron un mayor número de muestras para los 3 tipos de capítulos, obteniendo un 9% de alcachofas guías, un 62,5% de segundas y un 28,5% de terceras, lo que pudo repercutir en una mayor fiabilidad de los resultados. Se ha demostrado así que las alcachofas de tercer orden de esta variedad tienen una concentración fenólica mayor, seguidas de las secundarias y por último las guías, al contener una cantidad polifenólica un 54,5% y un 18,2% superior respectivamente que las alcachofas guías. Lo mismo ocurre con el estado de desarrollo, ya que, en este estudio, las alcachofas en un estado de desarrollo inicial o intermedio presentaron un contenido polifenólico superior a las que presentaban un estado interno de desarrollo más avanzado. Estos resultados concuerdan con el estudio de Giménez et al. (2021), donde las alcachofas de tercer orden también presentaron una cantidad de fenoles totales superior a los capítulos secundarios o principales, y que esta influencia es dependiente del cultivar.

Un contenido fenólico total alto en la alcachofa es responsable de la aparición del fenómeno de pardeamiento (Lattanzio et al., 2009; Peschel et al., 2006), que es un problema significativo para el procesado industrial. En el presente estudio, la menor concentración polifenólica apreciada para la variedad "Lorca" fue lograda por las alcachofas de tipo guía y/o de desarrollo interno avanzado, lo que demuestra su particular idoneidad para el procesado industrial estándar, y en especial, como producto recién cortado. Por el contrario, serán las alcachofas de tercer y segundo orden, así como las de estado interno inicial o intermedio las que tendrán una mayor aptitud para la comercialización en fresco al poseer un contenido en compuestos bioactivos superior, aportando así con su ingesta las propiedades beneficiosas para la salud que poseen estas sustancias funcionales y que ya han sido ampliamente estudiadas y demostradas (Ceccarelli et al., 2010; Pandino et al., 2011; De Falco et al., 2015).

La variabilidad cuantitativa y cualitativa de los nutrientes esenciales y metabolitos secundarios en las cabezas de alcachofa depende de la diversidad genética, la etapa fisiológica de desarrollo (tiempo de cosecha) y las condiciones climáticas durante el crecimiento de las plantas (Ceccarelli et al., 2010; Lombardo et al., 2010; Pandino et al., 2013). Asimismo, es de destacar para investigaciones futuras, que mientras que el nivel de polifenoles está fuertemente influenciado por los efectos del genotipo (Wang et al., 2003), la recolección de alcachofas bajo diferentes condiciones de temperatura en las diferentes fechas de corte también puede influir significativamente en los perfiles de fenólicos de estas (Moglia et al., 2008), lo que incrementa la diferenciación entre las distintas variedades y así como entre el orden de los capítulos. De igual forma, hasta donde conocemos, no existen estudios en los que, además de la variedad y el tipo de capítulo, se haya tenido en cuenta el factor estado interno de desarrollo de la propia alcachofa, por lo que los resultados obtenidos en este estudio han podido estar influenciados por este factor.

Conclusiones

Los resultados demuestran que, entre los factores estudiados, la variedad ha explicado el 13,88% de la variabilidad, el tipo de capítulo el 11,64% y el estado de desarrollo interno el 32,33%. De entre las cuatro variedades estudiadas (Blanca de Tudela, Lorca, Tupa y Green Queen) es en la variedad Lorca donde se presentan los resultados más fiables al disponer de un mayor tamaño muestral. Se pudo determinar que las alcachofas de tercer y segundo orden contienen una concentración fenólica superior que las alcachofas guía y, a su vez, este contenido polifenólico también será mayor en alcachofas con un estado interno más inicial que en aquellas con desarrollo avanzado, sin encontrar una interacción significativa entre ambos factores (tipo de capítulo y estado interno).

En lo referente a las otras variedades estudiadas, Blanca de Tudela, Tupac y Green Queen, son necesarios más experimentos para determinar la variabilidad de los factores, así como para corroborar los resultados obtenidos o si estos se han visto influenciados por los problemas agronómicos anteriormente citados. En próximos ensayos será necesario analizar un número de alcachofas equiparable o superior a la cantidad analizada en la variedad Lorca, con el fin de alcanzar unos resultados estadísticos más fiables.

Bibliografía

Brat, P., Georgè, S., Bellamy, A., Du Chaffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., Amiot, MJ., 2006. Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables. J. Nut., 136, 2368–2373. https://doi.org/10.1093/jn/136.9.2368

Cappelletti, R., Balducci, F., Diamanti, J., Mazzoni, L., Capocasa, F., Battino, M., Mezzetti, B., 2016. Agronomic and nutritional quality, and fresh and processing attitude, of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. *var. scolymus*) cultivars and an Italian landrace. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 91, 6, 634-644. https://doi.org/10.1080/14620316.2016.1208545

Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C., Giovannetti, M., 2010. Globe artichoke as a functional food. Med. J. Nutr. Metab. 3, 197–201. https://doi.org/10.1007/s12349-010-0021-z

De Falco, B., Incerti, G., Amato, M., Lanzotti, V., 2015. Artichoke: Botanical, Agronomical, Phytochemical and Pharmacological Overview. Phytochemistry Reviews, 14, 993–1018. https://doi.org/10.1007/s11101-015-9428-y

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization. www.fao.org. Consultada el 20 de julio de 2021.

Gagliardi, A., Giuliani, M.M., Carucci, F., Francavilla, M., Gatta, G., 2020. Effects of the Irrigation with Treated Wastewaters on the Proximate Composition, Mineral, and Polyphenolic Profile of the Globe Artichoke Heads [*Cynara cardunculus* (L.)]. Agronomy, 10, 1. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1284.31

Giménez, M.J., Abadía, R., Valero, D., Serrano, M., García-Pastor, M.E., Medina-Santamarina, J., Martínez-Esplá, A., Zapata, P.J., 2020. Variation in polyphenolic composition and physiological characteristics of 'Blanca de Tudela' cultivar affected by water stress. Acta Hortic, 1284, 235–240. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1284.31

Giménez, M.J., Giménez-Berenguer, M., García-Pastor, M.E., Parra, J., Zapata, P.J., Castillo, S., 2021. The influence of flower head order and gibberellic acid treatment on the hydroxycinnamic acid and luteolin derivatives content in globe artichoke cultivars. Foods, 10, 1813. https://doi.org/10.3390/foods10081813

Jiménez, S., Gascón, S., Luquin, A., Laguna, M., Ancín-Azpilicueta, C., Rodríguez-Yoldi, M.J., 2016. *Rosa canina* extracts have antiproliferative and antioxidant effects on Caco-2 human colon cancer. PLoS ONE, 11, e0159136. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159136

Jun, N., Jang, K., Kim, S., Moon, D., Seong, K., Kang, K., Tandang, L., Kim, P., Cho, S., Park, K., 2007. Radical Scavenging Activity and Content of Cynarin (1,3-dicaffeoylquinic acid) in Artichoke *(Cynara scolymus L.).* Journal of Applied Biological Chemistry, 50, 244–248.

Lattanzio, V., Cardinali, A., Di Venere, D., Linsalata, V., Palmieri, S., 1994. Browning phenomena in stored artichoke *(Cynara scolymus L.)* heads: Enzymatic or chemical reactions? Food Chemistry, 50, 1–7. https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90083-3

Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., and Cardinali, A., 2009. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. J. Funct. Foods, 1, 131–144. https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.002

Lombardo, S., Pandino, G., Mauro, R., Mauromicale, G., 2009. Variation of phenolic content in global artichoke in relation to biological, technical and environmental factors. Italian Journal of Agronomy, 4, 181–189. https://doi.org/10.4081/ija.2009.4.181

Lombardo, S., Pandino, G., Mauromicale, G., Knodler, M., Carle, R., Schieber, A., 2010. Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke (*Cynara cardunculus L. var. scolymus* (L.) Fiori]. Food Chem., 119, 1175–118. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.033

Martínez-Esplá, A., García-Pastor, M. E., Zapata, P. J., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., Gironés-Vilaplana, A., 2017. Preharvest application of oxalic acid improves quality and phytochemical content of artichoke (*Cynara scolymus* L.) at harvest and during storage. Food Chem. 230, 343–349. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.051

Moglia, A., Lanteri, S., Comino, C., Acquadro, A., De Vos, R., Beekwilder, J., 2008. Stress induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 8641–8649. https://doi.org/10.1021/jf801653w

Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G., 2011. Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus var. scolymus*) germplasm. J. Food Comp. Anal. 24, 148–153. https://doi.org/10.4081/ija.2012.e35

Pandino, G., Lombardo, S., Lo Monaco, A., Mauromicale, G., 2013. Choice of time of harvest influences the polyphenol profile of globe artichoke. J. Funct. Foods, 5, 1822–1828. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.001

Peschel, W., Sànchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzìa, I., Jimènez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., Codina, C., 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruits wastes. Food Chemistry, 97, 137–150. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.033

Pinelli, P., Agostini, F., Comino, C., Lanteri, S., Portis, E., Romani, A., 2007. Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves. Food Chem., 105, 1695–1701. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.014

Ruíz-Jiménez, J.M., Zapata, P.J., Serrano, M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., 2014. Effect of oxalic acid on quality attributes of artichokes stored at ambient temperature. Postharvest Biology and Technology, 95, 60–63. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.03.015

Schutz, K., Kammerer, D., Carle, R., Schieber A., 2004. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC–DAD-ESI/MS(n). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 4090–4096. https://doi.org/10.1021/jf049625x

Vázquez-Olivo, G., Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Uribe, JA., Osuna-Enciso, T., León-Félix, J., Basilio-Heredia, J., 2019. Cellular antioxidant activity and in vitro intestinal permeability of phenolic compounds from four varieties of mango bark (*Magnifera indica* L.). J. Sci. Food Agric., 99, 3481–3489. https://doi.org/10.1002/jsfa.9567

Wang, M., Simon, J.E., Aviles, I.F., He, K., Zheng, Q.-Y., Tadmor, Y., 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 601–608. https://doi.org/10.1021/jf020792b

Sesión 12:

Alimentación Funcional, Calidad Sensorial y Salud.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Esteroles vegetales en matrices líquidas: obtención e incorporación en una bebida de frutas

M. Alvarez-Henao [1], J. Londoño-Londoño [2] y C. Jimenez-Cartagena [2]

[1] Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, 050010, Medellín, Colombia.
email: mariavictoriaah@gmail.com
[2] Sosteli Group SAS. 055430. El Retiro- Antioquia, Colombia

Resumen

Los fitoesteroles (FE), son metabolitos secundarios similares al colesterol, tanto en función como en estructura, difieren de este último por el grupo metilo, etilo o insaturaciones presentes en su cadena lateral. Se encuentran ampliamente distribuidos en toda la naturaleza y han llamado la atención en diversos campos debido a su asociación con la reducción del colesterol en sangre. En este trabajo, se evaluó la incorporación en una bebida de naranja de FE obtenidos a partir del bagazo de caña de azúcar y encapsulados por medio del secado por atomización. Después de la adición de FE a la bebida, se evaluaron variables como: pH, SDT, conductividad y aceptación sensorial en el tiempo a dos temperaturas (10 y 20°C). Se estimó el efecto del consumo de la bebida de naranja con y sin FE en la inhibición del colesterol a nivel micelar, mediante un estudio de bioaccesibilidad con un modelo de digestión in vitro simulado. Como conclusión, se presenta que la bebida con adición micropartículas de FE, proporciona una reducción del 80% del colesterol presente en las micelas de la digestión simulada, sugiriendo que es posible contar con una alternativa de alimento funcional con FE en una matriz acuosa para la población en general.

Palabras clave: Fitoesteroles, bebida de naranja, microencapsulación, colesterol

Plant sterols in liquid matrices: obtaining and incorporating into a fruit beverage

Abstract

Phytosterols (PS), are secondary metabolites similar to cholesterol, both in function and structure, differ from this due to the methyl group, ethyl or unsaturation present in its side chain. They are widely distributed throughout nature and have attracted attention in various fields because of their association with the reduction of blood cholesterol. In this work, we evaluated the incorporation into an orange beverage of PS which were obtained from sugar cane bagasse and encapsulated for spray drying. After the addition of PS to the beverage, variables such as pH, TDS, conductivity and sensory acceptance in time at two temperatures (10 and 20°C) were evaluated. The effect of the consumption of orange beverage with and without PS on cholesterol inhibition at micellar level was estimated by a bioaccessibility study with a simulated in vitro digestion model. As a conclusion, it is presented that the beverage with addition of PS microparticles, provides a reduction of 80% of the cholesterol present in the micelles of simulated digestion, suggesting that it is possible to have a functional food alternative with PS in an aqueous matrix for the general population.

Keywords: Phytosterols, orange beverage, microencapsulation, cholesterol

Introducción

Los fitoesteroles (FE) son compuestos bioactivos obtenidos de las plantas, similares al colesterol tanto en estructura (núcleo esteroidal, grupo hidroxilo en el carbono 3β, y doble enlace en posición 5) como en función; sin embargo, difieren de este último por la estructura de su cadena lineal (Gylling et al. 2014), la cual podría contener grupos etilo o metilo o la presencia de insaturaciones. Estos compuestos han ido ganando importancia, ya que se estima que un consumo aproximado de 1,5 a 3 g FE/día, logra una disminución en los niveles de colesterol en plasma entre un 7-12% (Meng, Pan, & Liu, 2012; Lin et al., 2017), contribuyendo así a una reducción en el riesgo de enfermedad cardiovascular, dado que se considera el colesterol LDL alto como un factor importante en el desarrollo de enfermedades coronarias (EFSA -European Food Safety Authority-, 2006; Alvarez-Sala et al., 2016; Food and Drug Administration, 2016), siendo uno de los mecanismos por el cual los FE ejercen su función, la competición con el colesterol a nivel intestinal (Alemany et al. 2013). Cabe destacar que los FE no pueden ser sintetizados por el hombre, por lo que su ingesta depende de la dieta (de Jong, Plat, and Mensink 2003), siendo alimentos de origen vegetal (Gylling et al. 2014), como aceites vegetales, granos, semillas, frutas, verduras (Normén et al. 2007) y alimentos con adición de estos su fuente principal.

A pesar de los beneficios reportados por los FE en la salud, su empleo ha sido limitado debido a sus altos puntos de fusión y baja solubilidad tanto en agua como en aceite (Meng, Pan, and Liu 2012). A pesar de esto, cuando los FE se esterifican con ácidos grasos, aumenta su solubilidad en grasa, haciendo posible su incorporación en diferentes productos alimenticios (Nieminen et al. 2016), como margarinas (Lin et al. 2017), productos lácteos, barras de snacks, panes (Bano, 2013; Barriuso, Astiasarán, & Ansorena, 2016), entre otros.

La aplicación de técnicas como secado por aspersión contribuye a aumentar la dispersión de los FE en matrices alimentarias acuosas, mejorando su solubilidad (Chen et al., 2013; Nosari et al., 2015; Di-Batista et al., 2017), atributos sensoriales, propiedades de funcionalidad (Alvim et al. 2013) y aplicación a otras matices, como en bebidas, en las cuales algunos estudios han demostrado las propiedades de los FE en la salud del consumidor (Katan et al., 2003; Devaraj et al., 2006; AbuMweis et al., 2008) ofreciendo resultados comparables a los obtenidos con matrices grasas. De igual forma, una herramienta importante para evaluar la efectos positivos o negativos de la estructura de los alimentos, con el objetivo de mejorar la formulación de un producto es la bioaccesibilidad (Cilla et al. 2019), la cual se analiza mediante procedimientos de digestión *in vitro*, generalmente simulando la digestión gástrica e intestinal (Carbonell-Capella et al. 2014).

Material y Métodos

Micropartículas de fitoesteroles

La extracción de fitoesteroles a partir del bagazo de caña de azúcar seco y molido, fue realizada en el equipo de fluidos supercríticos semi-industrial de 12 L de capacidad (Guangzhou Weiya Economic Training Co Ltda, China) a las condiciones de extracción de 40°C y 400 bar, empleando dióxido de carbono (CO2) como solvente, durante 210 min (Alvarez-Henao et al. 2022). Posteriormente el extracto obtenido fue encapsulado en un equipo de secado por aspersión Mini-Buchi B-290 (BUCHI Labortechnik AG, Suiza). Las condiciones de operación para el secado, fueron tomadas del estudio de Di-Batista, Constenla, Ramírez Rigo, & Piña, (2017), con algunas modificaciones, temperatura de entrada 165°C, flujo de aire de atomización 42mm, flujo de alimentación 10%, aspirador 80%. La emulsión de alimentación para este proceso constó de una mezcla de extracto:agentes encapsulantes (Maltodextrina:proteína aislada de soya y goma arábiga) de 1:3.

Incorporación de fitoesteroles en matriz acuosa

La matriz seleccionada para adicionar las micropartículas de FE, correspondió a una bebida de naranja comercial, 100% de natural y sin conservantes, adquirida en un mercado local (Medellín, Colombia). La concentración de FE libres por porción de 250 mL correspondió a 0,4g de FE. La bebida fue homogenizada manualmente, envasada en un ambiente aséptico, en botellas de polietileno tereftalato (PET) de tapa rosca. Las bebidas con y sin adición de FE, fueron almacenadas en oscuridad y refrigeración, hasta la realización de los análisis microbiológico, sensorial y fisicoquímico.

Caracterización inicial de la bebida

Los análisis microbiológicos realizados constaron de la determinación de Coliformes totales y fecales (E. coli), de acuerdo a la metodología planteada en la NTC 4458 (2018), recuento de aerobios mesófilos según la NTC 4519 (2009) y de mohos y levaduras (NTC 5698-1 2009).

La evaluación sensorial, constó de un análisis descriptivo cuantitativo QDA, realizado por 6 jueces entrenados según la norma ISO 8586:2014 y la NTC 3932:1996 (Icontec 1996), para los descriptores sensoriales, calificados en una escala de intensidad de 10 puntos. Donde 0,0 es ausencia del atributo, 0,6-2,9 muy leve; 3,0-4,9 leve; 5,0-6,9 moderada, 7,0-8,9 marcado y 9,0-10,0 muy marcado el descriptor analizado.

Estimación de vida útil de bebida de naranja

Las bebidas de naranja sin adición de FE (BNC) y con adición de estos (BFE), fueron almacenadas en dos condiciones controladas de temperatura (10 y 20°C), en ausencia de luz directa y evaluando algunas propiedades fisicoquímicas y sensoriales, cada cierto tiempo.

Los análisis fisicoquímicos llevados a cabo correspondieron a medición de pH (método potenciométrico), sólidos disueltos totales y conductividad (determinados con conductivímetro TDS/ EC). La evaluación sensorial, correspondió a una prueba de aceptación realizada con 10 consumidores frecuentes de bebidas de naranja, entre 20-65 años; los cuales evaluaron el sabor y satisfacción general sobre las bebidas, usando una escala hedónica de 9 puntos (1 = me disgusta extremadamente, 2 = me disgusta mucho, 3 = me disgusta moderadamente, 4 = me disgusta un poco, 5 = no me gusta/ ni me disgusta, 6 = me gusta poco, 7 = me gusta moderadamente, 8 = me gusta mucho, 9 = me gusta extremadamente), como es sugerido por Janzantti et al., (2014).

Digestión *in vitro* de bebidas de naranja

El modelo de digestión in vitro, empleado en este estudio para determinar la inhibición de colesterol en presencia de bebida de naranja con micropartículas de FE, se basó en la metodología planteada por Navarro del Hierro et al., (2018) con algunas modificaciones. Brevemente, en la fase gástrica, 1,5 mL de bebida (con o sin adición de FE), fueron mezcladas con 3 mg de lecitina de soya, 8 mg de colesterol y aceite de soya. Se adicionaron 2,2 mL de solución gástrica (150 mM NaCl, 6mM CaCl2 y HCl, pH 2,5) y la mezcla se agitó a 220 rpm por 2 min, en una incubadora a 37°C con agitación orbital; posteriormente se incorporaron 0,45 mL del extracto fresco de enzimas gástricas (50 mg de lipasa gástrica y 15 mg de pepsina en 3 mL de la solución gástrica), continuando su agitación por 45 min. Se agregaron 1,9 mL de la secreción biliar (50 mg de lecitina, 125 mg de sales biliares, 0,25 mL de solución de 325 mM CaCl2, 0,75 mL de solución NaCl a 3,25 M y 5 mL de buffer Tris-maleato), se continuó en agitación por 2 min a 190 rpm y 37°C. Se adicionó 0,45 mL de extracto de pancreatina fresco (0,5 g de pancreatina porcina en 3 mL de buffer Tris-maleato), agitando durante 60 min.

Determinación de bioaccesibilidad

Una vez finalizada la fase intestinal, el medio fue sometido a centrifugación a 4000 rpm durante 40 min. La fase micelar fue separada del precipitado y la bioaccesibilidad del colesterol calculada, según la Ecuación 1

Bioaccesibilidad (%)= [Cantidad del colesterol en la fase micelar / Cantidad del colesterol en el medio de digestión total] x100 (1)

Resultados y Discusión

Las micropartículas de FE presentaron un rendimiento de secado del 65%, eficiencia de encapsulación del 73%, actividad de agua de 0,39, humedad del 9%, solubilidad en agua de 0,98 g/mL y tamaño de partícula de 23 µm. El rendimiento de secado fue mayor a la obtenida en el trabajo realizado por Di Battista, Constenla, Ramírez-Rigo, & Piña, (2015), empleando goma arábiga y maltodextrina en relación 3:1, la cual correspondió a un 65%. Con respecto a la actividad de agua y humedad, los valores obtenidos hacen referencia a la estabilidad microbiológica de un producto (Comunian and Favaro-Trindade 2016). Por otra parte, el valor de solubilidad que presentan las micropartículas, las hace clasificarlas en fácilmente solubles, según la Farmacopea (European Pharmacopeia, 2014). También es de resaltar que el tamaño de partícula encontrado favorecer la biodisponibilidad de FE (<25 µm) dentro de las micelas intestinales (Di-Battista et al. 2013, 2015) ya que estas partículas, pueden ser fácilmente atacadas por las sales biliares, favoreciendo procesos de bioactividad posteriores.

Caracterización inicial de la bebida

Los resultados microbiológicos obtenidos, tanto de la bebida de naranja sin FE (BNC) y con adición de FE (BFE), se muestran en la tabla 1, los cuales son comparados con los límites permisibles para las frutas y las bebidas con adición de bebida (zumo) o pulpa de fruta, o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de estos que se procesen, empaquen, transporten, importen y comercialicen en el territorio colombiano, según la resolución 3929, (2013), específicamente para Bebidas (zumo) pasteurizados edulcorados o no.

Tabla 1 Análisis microbiológicos de la bebida de naranja control y con adición de fitoesteroles.

Análisis realizado	Bebida de naranja Control (BNC)	Bebida de naranja con FE (BFE)	Especificación
Recuento Coliformes totales	<10 ufc/mL	<10 ufc/Ml	N/A
Recuento Coliformes fecales (*E. coli*)	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL
Recuento Aerobios mesófilos	20 ufc/mL	45 ufc/mL	1000 - 3000 ufc/mL
Recuento Mohos y levaduras	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	100-200 ufc/mL

La calidad microbiológica de ambas bebidas de naranja cumple con todas las especificaciones necesarias para ser considerado apto para el consumo, según la normativa colombiana (Resolución 3929 2013).

Análisis sensorial

El propósito de la prueba sensorial, análisis descriptivo cuantitativo (QDA- Quantitive Descriptive Analysis) es describir y cuantificar la intensidad de los atributos sensoriales de olor y sabor percibidos en los alimentos. En la figura 1, se aprecian los descriptores analizados en el análisis QDA para las dos bebidas.

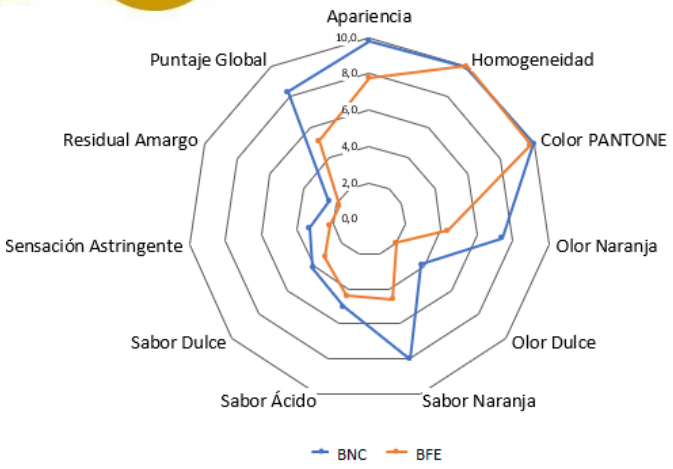


Figura 1 Análisis descriptivo cuantitativo (QDA), Intensidades de los descriptores sensoriales para las muestras de BNC y BFE.

Para la BNC, los descriptores de apariencia, homogeneidad, olor y sabor naranja y puntaje global, se percibieron con una intensidad alta (marcada o muy marcada), pero los atributos de olor y sabor dulce, sensación astringente y residual amargo, en menor intensidad (leve o muy leve). El color de referencia en esta bebida correspondió a PANTONE® 113 C. Esta muestra control, permite distinguir las propiedades iniciales de la bebida de naranja antes de la adición de FE encapsulados y diferenciar cuales son los atributos que más se afectan. Con respecto al BFE, los descriptores de apariencia y homogeneidad, continúan presentándose en mayor intensidad; y el olor y sabor dulce, sabor ácido, sensación astringente y residual amargo, se perciben en intensidad leve o muy leve, numéricamente menor que con la BNC. Además, se puede comparar que los descriptores de olor y sabor a naranja, fueron los atributos que más variaron al adicionar las micropartículas a la bebida. El color de referencia para el JPE fue el PANTONE® 127 C.

La importancia del análisis sensorial de la bebida con FE, radica en que la selección de consumir o no un alimento por su valor nutricional, no es suficiente; es necesario tener en cuenta factores culturales y psicológicos de los consumidores, al igual que su percepción global del sabor (Fuentes et al. 2010), incluyendo en menor medida, pero sin ser menos importantes la visión, el olor y los sonidos que produce un alimento al ingerirlo. Es así como el sentido del gusto está relacionado con la toma de decisiones, sobre si un alimento será o no aceptado por el consumidor; y un factor que influye en este es la percepción de sustancias amargas (las cuales son rechazadas de forma innata) (Mizraji et al. 2011), por lo que la reducción de este descriptor en la BFE, se puede considerar favorable.

En cuanto al gusto acido, producido por los hidrogeniones (ácido cítrico) (López-Ortiz 2015; Mizraji et al. 2011), al incorporar los microencapsulados de FE que contienen proteína de soya, ésta aumenta ligeramente el pH en la bebida, reduciendo la sensación acido, al igual que la intensidad y duración de la percepción de astringencia; observándose que los ácidos orgánicos afectan la astringencia solo a través de su capacidad para modificar el pH del medio (Ramírez Torrealba 2012).

Estimación de vida útil de las bebidas de naranja

En las bebidas de fruta, una de las principales causas de deterioro es el crecimiento de microorganismos, los cuales se pueden desarrollar adecuadamente si encuentran condiciones favorables de pH , disponibilidad de agua y sustrato para descomponer (Carrillo Inungaray and Reyes Munguía 2013); es por ello que después de hacer un seguimiento por aproximadamente 45 días a las bebidas de naranja (BNC y BFE), se evaluaron los cambios de algunos parámetros químicos a través del tiempo (figura 2), que influyen directamente en la vida útil del alimento, puesto que los sólidos totales y el pH son los parámetros químicos frecuentemente evaluados en los frutos y sus bebidas y son considerados como los indicadores críticos de la calidad sensorial (Schvab et al. 2013).

En la figura 2a, se observa que BFE tanto a 10°C como a 20°C, presentan un comportamiento similar en el pH hasta el día 14; después de este punto se encuentran diferencias estadísticas entre las muestras ($p<0,001$), debido a que la temperatura acelera los cambios de pH en esta muestra. Contrario a lo que pasa con la BNC a 10 y 20°C; en el que solo se encuentran diferencias en algunos puntos, pero si una tendencia constante al cambio, mostrando menor dependencia a la temperatura en el parámetro evaluado.

El pH inicial de las bebidas de naranja (3,17 y 3,35 para BNC y BFE, respectivamente), a pesar que cumple con el pH exigido por la legislación nacional (Resolución 3929 2013), se encuentran fuera de los valores planteados por diferentes autores para este tipo de productos con un rango de pH de 3,5 a 4,40 (Polydera et al., 2003, 2005; Elez-Martínez et al., 2005; Rahman, 2007; Walkling-Ribeiro et al., 2009). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los posibles cambios de pH de las bebidas estudiadas, con respecto a trabajos de referencia, corresponden a factores como la variedad del cultivo, maduración, condiciones de crecimiento, áreas geográficas, manipulación y procesamiento (Rahman 2007) entre otras.

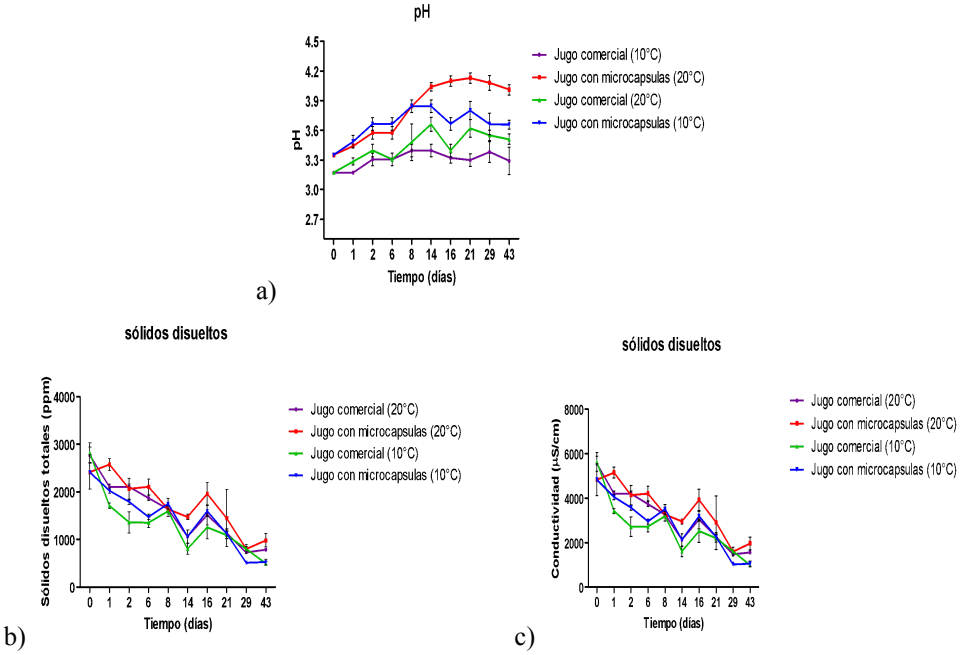


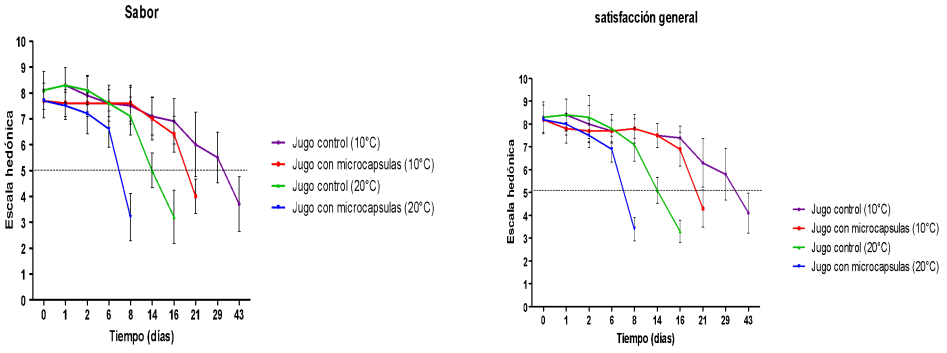
Figura 2. Evaluación de diferentes parámetros fisicoquímicos de las bebidas en el tiempo. a) pH, b) sólidos disueltos y c) conductividad, ( ) BFE a 10°C, ( ) BNC a 10°C, ( ) BFE a 20°C y ( ) BNC a 20°C.

En cuanto a la tendencia similar que presentan tanto los sólidos disueltos totales (SDT) como la conductividad eléctrica, es normal ya que estos parámetros están estrechamente relacionados (la conductividad es directamente proporcional a SDT en relación 2µS/cm: 1 ppm). Aunque, se encuentran ligeras diferencias en los valores de SDT y conductividad, entre las BNC y BFE, estas no son significativas ($p<0,05$) a una misma temperatura, pero si en algunos puntos con cambios de temperatura. Esto es entendible dado que la temperatura afecta la viscosidad, y con ello, el movimiento iónico de la solución (bebida de naranja); el aumento de temperatura reduce la viscosidad, facilitando el transporte iónico, por lo que la medida de conductividad se aumenta (Hanna-instruments 2020). La conductividad en algunos alimentos como bebida de manzana (2300 a 2600 µS/cm) (Evrendilek et al. 2000), bebida de naranja tratado con termosonicación y pulsos eléctricos (4170 µS/cm)(Walkling-Ribeiro et al. 2009), o bebida de naranja pasteurizado térmicamente (4390 µS/cm)(Elez-Martínez, Soliva-Fortuny, and Martín-Belloso 2005), es mucho menor a las obtenidas en este estudio al momento inicial (mayor a 5000µS/cm), lo que sugiere indirectamente que nuestras

bebidas contienen más sólidos disueltos (bien sea por el contenido de pulpa, de microcápsulas o por la ausencia de un proceso de filtración), que permite que la conductividad sea mayor.

Con respecto a la evaluación sensorial llevada por consumidores, en la figura 3, se puede determinar que la aceptación general de la bebida estuvo mayormente afectada por el atributo de sabor; dado que se presentó un comportamiento similar en ambas graficas. Este aspecto, fue similar al obtenido con la evaluación sensorial de la pulpa de maracuyá pasteurizada y sin pasteurizar, donde se determinó que el sabor es el parámetro que más influye en la aceptación general del producto a los consumidores (Janzantti, Santos, and Monteiro 2014).

Aplicando análisis de varianza para cada uno de los datos obtenidos en el atributo de sabor, no se encuentran diferencias significativas (p>0.05) entre BNC y BFE a 10°C hasta el día 16; después de este día la BFE reduce notablemente su aceptación, por lo que empieza a tener una respuesta de ligero desagrado; a partir de este punto, solo se continúa haciendo sensorial al BNC. Con respecto a las muestras que estuvieron a 20°C, a partir del día 1, se presentan diferencias significativas (p<0.05) para el sabor, las cuales se hacen más marcadas desde el día 6 (p<0,01). Al comparar la BFE respecto a las diferentes temperaturas, desde el día 6, se empiezan a marcar diferencias (resultados iguales para aceptación general de la bebida).



a)

Figura 3. Evaluación de parámetros sensoriales de las bebidas en el tiempo. a) sabor y b) aceptación general de (‾) BFE a 20°C; (‾) BNC a 10°C; (‾) BFE a 10°C; (‾) BNC a 20°C; (---) límite mínimo de aceptación

El rechazo de los consumidores a las bebidas a través del tiempo puede estar relacionado con el deterioro de estas por aerobios mesófilos tales como hongos, levaduras, y bacterias acido lácticas (Janzantti et al., 2014) que contribuyen a un aumento de la acidez en bebidas (Elez-Martínez, Soliva-Fortuny, and Martín-Belloso 2005), producto que se genera del proceso fermentativo. Además, aunque los análisis químicos son necesarios para establecer interacciones entre los componentes de los alimentos, con ellos no es posible evaluar todos los estímulos sobre los sentidos del consumidor (Schvab et al. 2013); lo que hace necesario que aparte de variables fisicoquímicas, se tengan en cuenta factores que intervienen en el rechazo de los alimentos, como lo son la temperatura, tipo de alimento, edad del consumidor y aspectos genéticos que afectan la respuesta hedónica de los consumidores (López-Ortiz 2015).

Bioaccesibilidad del colesterol

En la figura 4, se muestra el cambio de la bioaccesibilidad de colesterol en presencia de BNC (19,33 ± 1,43%) y BFE (3,27 ± 0,25%) de acuerdo con el modelo de digestión in vitro evaluado, presentando diferencias estadísticas entre sí. Por lo que se puede determinar que la adición de microparticulas de FE en la bebida de naranja ejerce un efecto sinérgico en la reducción del colesterol bioaccesible.

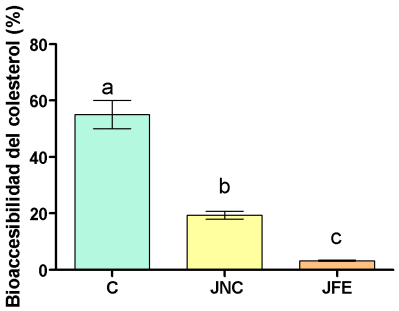


Figura 4. Efecto de las muestras: C (Control de colesterol), BNC y BFE sobre la bioaccesibilidad del colesterol. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras.

Este resultado es posible dada la presencia de otros compuestos minoritarios en la bebida, como lo son los carotenoides, los cuales también se absorben ingresando a la micela mixta (Fernández-García et al. 2012) y pueden reducir la cantidad de colesterol que ingrese en ellas. De igual forma, debido a las propiedades de la bebida de naranja, el cual es una fuente de vitaminas y otros nutrientes como carotenoides, flavonoides (hesperidina y narirutina), folato y vitamina C, los cuales hacen de esta bebida una excelente fuente de antioxidantes, que ha demostrado que reduce el colesterol total en personas normo-colesterolémicas (Devaraj et al., 2004; Aschoff et al., 2015). La reducción en la bioaccesibilidad del colesterol en presencia de la bebida de naranja puede deberse a la fibra soluble que la matriz contiene, la cual impide el adecuado proceso de micelización ya que el contenido biliar se solubiliza fácilmente en los geles que se forman durante la digestión (Fernández-García et al. 2012; Rodríguez-Roque 2014), impidiendo formación de micelas.

Conclusiones

La incorporación de micropartículas de FE en la bebida de naranja, modifica ligeramente parámetros sensoriales, fisicoquímicos y microbiológicos al inicio del estudio al ser comparado con la bebida control. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, el parámetro sensorial, se ve notablemente afectado cuando se almacena a 20°C.

Al evaluar la inhibición del colesterol en presencia del BFE, es posible determinar que se proseguir con modelos in vivo, ya que esta primera parte de análisis de bioaccesibilidad dio resultados prometedores.

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias, mediante la convocatoria 727 de 2015, doctorados nacionales.

Bibliografía

AbuMweis, Suhad S., Roula Barake, and Peter J H Jones. 2008. “Plant Sterols/Stanols as Cholesterol Lowering Agents: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.” *Food and Nutrition Research* 52: 1–17.

Alemany, Laia et al. 2013. “Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on Plant Sterols and Their Oxides in Enriched Beverages.” *Food Research International* 52(1): 1–7. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.024.

Alvarez-Henao, María Victoria et al. 2022. “Supercritical Fluid Extraction of Phytosterols from Sugarcane Bagasse: Evaluation of Extraction Parameters.” *The Journal of Supercritical Fluids* 179.

Alvarez-Sala, Andrea et al. 2016. “Impact of Lipid Components and Emulsifiers on Plant Sterols Bioaccessibility from Milk-Based Fruit Beverages.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(28): 5686–91.

Alvim, Izabela Dutra et al. 2013. "Use of the Spray Chilling Method to Deliver Hydrophobic Components : Physical Characterization of Microparticles." *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 33: 34–39.

Aschoff, Julian K. et al. 2015. "In Vitro Bioaccessibility of Carotenoids, Flavonoids, and Vitamin C from Differently Processed Oranges and Orange Juices [Citrus Sinensis (L.) Osbeck]." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(2): 578–87.

Bano, Rafia. 2013. "Phytosterols in Human Nutrition." *international journal of Scientific Research and Reviews* 2(2): 1–10.

Barriuso, Blanca, Iciar Astiasarán, and Diana Ansorena. 2016. "Unsaturated Lipid Matrices Protect Plant Sterols from Degradation during Heating Treatment." *Food Chemistry* 196: 451–58. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.074.

Carbonell-Capella, Juana M. et al. 2014. "Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(2): 155–71.

Carrillo Inungaray, María Luisa, and Abigail Reyes Munguía. 2013. "Vida Útil de Los Alimentos." *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias* 2(3).

Chen, Qiong et al. 2013. "Properties and Stability of Spray-Dried and Freeze-Dried Microcapsules Co-Encapsulated with Fish Oil, Phytosterol Esters, and Limonene." *Drying Technology* 31(6): 707–16.

Cilla, Antonio et al. 2019. "Development of Functional Beverages: The Case of Plant Sterol-Enriched Milk-Based Fruit Beverages." In *Functional and Medicinal Beverages*, , 285–312.

Comunian, Talita A., and Carmen S. Favaro-Trindade. 2016. "Microencapsulation Using Biopolymers as an Alternative to Produce Food Enhanced with Phytosterols and Omega-3 Fatty Acids: A Review." *Food Hydrocolloids*.

Devaraj, Sridevi, Ishwarlal Jialal, and Sonia Vega-Lopez. 2004. "Plant Sterol-Fortified Orange Juice Effectively Lowers Cholesterol Levels in Mildly Hypercholesterolemic Healthy Individuals." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(3): e25–28.

Devaraj, Sridevi, Bryce C. Autret, and Ishwarlal Jialal. 2006. "Reduced-Calorie Orange Juice Beverage with Plant Sterols Lowers C-Reactive Protein Concentrations and Improves the Lipid Profile in Human Volunteers." *American Journal of Clinical Nutrition* 84(4): 756–61.

Di-Battista, Carla Agustina et al. 2013. "Microencapsulación de Fitoesteroles Mediante Secado Por Atomización: Influencia de La Temperatura de Secado." In *AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos*,.

Di-Battista, Carla Agustina, Diana Constenla, María Verónica Ramírez-Rigo, and Juliana Piña. 2015. "The Use of Arabic Gum, Maltodextrin and Surfactants in the Microencapsulation of Phytosterols by Spray Drying." *Powder Technology* 286: 193–201. http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.016.

Di-Batista, Carla Agustina, Diana Constenla, María Verónica Ramírez Rigo, and Juliana Piña. 2017. "Process Analysis and Global Optimization for the Microencapsulation of Phytosterols by Spray Drying." *Powder Technology* 321: 55–65. http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2017.08.008.

EFSA -European Food Safety Authority-. 2006. *Plant Stanol Esters and Blood Cholesterol - Scientific Substantiation of a Health Claim Related to Plant Stanol Esters and Lower/Reduced Blood Cholesterol and Reduced Risk of (Coronary) Heart Disease Pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006*. http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/825.

Elez-Martínez, Pedro, Robert C Soliva-Fortuny, and Olga Martín-Belloso. 2005. "Comparative Study on Shelf Life of Orange Juice Processed by High Intensity Pulsed Electric Fields or Heat Treatment." *European Food Research and Technology* 222(3): 321. https://doi.org/10.1007/s00217-005-0073-3.

European Pharmacopeia. 2014. *Solubility-Characters*. https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/godkendelse/kontrol-og-inspektion/~/media/D0991097DDB34313879B9A79CD12FA20.ashx.

Evrendilek, G.Akdemir et al. 2000. "Microbial Safety and Shelf-Life of Apple Juice and Cider Processed by Bench and Pilot Scale PEF Systems." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1(1): 77–86. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856499000041.

Fernández-García, Elisabet et al. 2012. "Carotenoids Bioavailability from Foods: From Plant Pigments to Efficient Biological Activities." *Food Research International* 46: 438–50.

Food and Drug Administration. 2016. *21CFR101.83. Health Claims: Plant Sterol/Stanol Esters and Risk of Coronary Heart Disease (CHD)*. Estados Unidos. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=101.83.

Fuentes, Aler et al. 2010. "Sensopercepción Gustativa: Una Revisión." *International journal of odontostomatology* 4: 161–68.

Gylling, Helena et al. 2014. "Plant Sterols and Plant Stanols in the Management of Dyslipidaemia and Prevention of Cardiovascular Disease." *Atherosclerosis* 232: 346–60.

Hanna-instruments. 2020. "Conductividad y Sólidos Disueltos." *Blog*. https://www.hannainst.es/blog/79/conductividad-y-solidos-disueltos (February 22, 2021).

Icontec. 1996. "NTC 3932:1996. Análisis Sensorial. Identificación y Selección de Descriptores Para Establecer Un Perfil Sensorial Por Una Aproximación Multidimensional."

ISO - International Organization for Standardization. 2016. *ISO 8586:2014 Sensory Analysis — General Guidelines for the Selection, Training and Monitoring of Selected Assessors and Expert Sensory Assessors*.

Janzantti, Natália S., Graciela C. Santos, and Magali Monteiro. 2014. "Shelf Life of Fresh and Pasteurized Organic Passion Fruit (Passiflora Edulis F. Flavicarpadeg.) Pulp." *Journal of Food Processing and Preservation* 38(1): 262–70.

de Jong, Ariënne, Jogchum Plat, and Ronald P Mensink. 2003. "Metabolic Effects of Plant Sterols and Stanols (Review)." *The Journal of nutritional biochemistry* 14(7): 362–69.

Katan, Martijn B. et al. 2003. "Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels." *Mayo Clinic Proceedings* 78(8): 965–78.

Lin, Yuguang et al. 2017. "Thermal Stability of Plant Sterols and Formation of Their Oxidation Products in Vegetable Oils and Margarines upon Controlled Heating." *Chemistry and Physics of Lipids* 207: 99–107.

López-Ortiz, Norma Constanza. 2015. "La Cuestión de Las Sensaciones Gustativas Básicasle." *Perspectivas en nutrición humana* 17(2): 185–94. http://www.scielo.org.co/pdf/penh/v17n2/0124-4108-penh-17-02-00185.pdf.

Meng, Xianghe, Qiuyue Pan, and Yun Liu. 2012. "Preparation and Properties of Phytosterols with Hydroxypropyl β-Cyclodextrin Inclusion Complexes." *European Food Research and Technology* 235(6): 1039–47.

Mizraji, M., F. Kokenc, C Ingver, and J. San Millán. 2011. "El Sentido Del Gusto." *Actas odontológicas* 8(2).

Navarro del Hierro, Joaquín et al. 2018. "Ultrasound-Assisted Extraction and Bioaccessibility of Saponins from Edible Seeds: Quinoa, Lentil, Fenugreek, Soybean and Lupin." *Food Research International* 109(April): 440–47.

Nieminen, V. et al. 2016. "Plant Stanol Content Remains Stable during Storage of Cholesterol-Lowering Functional Foods." *Food Chemistry*.

Normén, Lena et al. 2007. "A Phytosterol Database: Fatty Foods Consumed in Sweden and the Netherlands." *Journal of Food Composition and Analysis* 20(3–4): 193–201.

Nosari, Anna B F L et al. 2015. "Improved Green Coffee Oil Antioxidant Activity for Cosmetical Purpose by Spray Drying Microencapsulation." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25(3): 307–11.

NTC 4458. 2018. "Microbiología de Alimentos y de Alimentos Para Animales. Método Horizontal Para El Recuento de Coliformes o Escherichia Coli o Ambos. Técnica de Recuento de Colonias Utilizando Medios Fluorogénicos o Cromogénicos."

NTC 4519. 2009. "Microbiología de Los Alimentos Para Consumo Humano y Animal. Método Horizontal Para

El Recuento de Microorganismos. Técnica de Recuento de Colonias a 30 °C."

NTC 5698-1. 2009. "Microbiología de Alimentos y Alimentos Para Animales. Método Horizontal Para La Enumeración de Mohos y Levaduras. Parte 1: Técnica de Recuento de Colonias En Productos Con Actividad Acuosa (Aw) Superior a 0,95."

Polydera, A C, N G Stoforos, and P S Taoukis. 2003. "Comparative Shelf Life Study and Vitamin C Loss Kinetics in Pasteurised and High Pressure Processed Reconstituted Orange Juice." *Journal of Food Engineering* 60(1): 21–29. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877403000062.

———. 2005. "Quality Degradation Kinetics of Pasteurised and High Pressure Processed Fresh Navel Orange Juice: Nutritional Parameters and Shelf Life." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6(1): 1–9. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856404001031.

Rahman, M. Shafiur. 2007. 35 Food Research International *Handbook of Food Preservation*. second edi. CRC Press.

Ramírez Torrealba, Constanza Jerusha. 2012. "Factores Físicos y Químicos Que Intervienen En La Interacción Tanino-Proteína y Su Relación Con La Sensanción de Astringencia." Universidad de Chile.

Resolución 3929. 2013. "Reglamento Técnico Sobre Los Requisitos Sanitarios Que Deben Cumplir Las Frutas y Las Bebidas Con Adicion de Jugo (Zumo) o Pulpa de Fruta, o Concentrados de Fruta, Clarificados o No, o La Mezca de Estos Que Se Procesen, Empaquen, Transporten, Importen."

Rodríguez-Roque, María Janeth. 2014. "In Vitro Bioaccessibility of Health-Related Compounds from Beverages Based on Fruit Juice, Milk or Soymilk: Influence of Food Matrix and Processing." Universidad de Lleida.

Schvab, Maria del C.;, Maria M.; Ferreyra, Liliana M. Gerard, and Cristina V Davies. 2013. "Parámetros de Calidad de Jugos de Naranja Entrerrianas." *Revista Iberoamericana de TecnologíaPostcosecha* 14(1): 85–92. https://www.redalyc.org/pdf/813/81327871015.pdf.

Walkling-Ribeiro, M et al. 2009. "Shelf Life and Sensory Evaluation of Orange Juice after Exposure to Thermosonication and Pulsed Electric Fields." *Food and Bioproducts Processing* 87(2): 102–7. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308508000801.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Microencapsulación de *L. Plantarum* en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y de la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica

E. López-Martínez [1], MJ. Frutos [2] y E. Valero-Cases [1]

[1] Universidad Miguel Hernández, Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Ctra. Beniel km 3,2 03312 Orihuela, Alicante. e-mail: [1]evelin.lópez@goumh.umh.es; [1]e.valero@umh.es
[2] mj.frutos@umh.es

Resumen

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del huésped. Las técnicas de microencapsulación, permiten la introducción de probióticos en los alimentos mejorando su supervivencia. El objetivo de este trabajo fue la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* en cápsulas sin recubrimiento y con recubrimiento para evaluar el efecto de protección sobre la viabilidad de *L. plantarum* frente al proceso de producción, al estrés secuencial durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y a condiciones de alta temperatura (50-80 ºC). La encapsulación simple se realizó usando la técnica de extrusión en matriz de alginato de sodio al 2 %, goma xantana y glicerol. Para crear una doble capa como cubierta protectora se usó agar-agar e inulina. También se analizaron las propiedades fisicoquímicas como el diámetro, la actividad de agua y la eficacia de encapsulación. Los resultados mostraron que la encapsulación con doble capa, consiguió una elevada supervivencia de 7,16 Log UFC/mL y la liberación del 87% del probiótico al medio externo, al finalizar el periodo de digestión gastrointestinal. A su vez, la capsulas con doble capa mostraron mejores propiedades termoprotectoras del microorganismo frente a las condiciones de tratamiento térmico, obteniendo mayor tasa de supervivencia que en las cápsulas sin recubrimiento, pudiendo ser de interés su inclusión en el desarrollo de alimentos funcionales.

Palabras clave: alginato, probiótico, supervivencia, digestión in vitro, extrusión.

Microencapsulation of L. plantarum in single and double-layer capsules: effect of thermal conditions and gastrointestinal digestion on probiotic viability

Abstract

Probiotics are living microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host. Microencapsulation techniques allow the introduction of probiotics into foods, improving their survival. The aim of this work has been the microencapsulation of Lactobacillus plantarum in uncoated and coated capsules to evaluate the protective effect on the viability of L. plantarum against the production process, the sequential stress during the *in vitro* gastrointestinal digestion process and at high temperature conditions (50-80 ºC). Simple encapsulation was performed using the 2% sodium alginate, xanthan gum and glycerol matrix extrusion technique. Agar-agar and inulin were used to create a double layer as a protective cover. Physicochemical properties such as diameter, water activity and encapsulation efficiency were also analyzed. The results showed that the double layer encapsulation achieved a high survival of 7.16 Log CFU / mL and the release improved and the release of the probiotic of 87% of the probiotic to the external environment, at the end of the gastrointestinal digestion period. In turn, the double-layer capsules showed better thermoprotective properties of the microorganism against heat treatment conditions, obtaining a higher survival rate than the capsules without coating r, and their inclusion in the development of functional foods may be of interest.

Keywords: alginate, probiotic, survival, in vitro digestion, extrusion.

Introducción

Actualmente, los consumidores muestran una creciente preocupación por la seguridad y calidad de los alimentos, ya que son conscientes de la relación entre la alimentación y la prevención de enfermedades (Reque y Brandelli, 2021). Por lo tanto, la industria alimentaria presenta un gran interés en el desarrollo de nuevos alimentos que contribuyan al bienestar y mejora de la salud de los consumidores. Estos alimentos reciben el nombre de "alimentos funcionales" donde uno o varios de sus componentes aportan propiedades nutricionales que generan un efecto beneficioso en el organismo, mejorando la salud y disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades (cardiovasculares, diabetes y obesidad entre otras) (Santini et al., 2018). Dentro de los alimentos funcionales, destacan los alimentos probióticos, siendo ¨microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped¨ (FAO/OMS, 2001). Estos microorganismos deben estar identificados a nivel de género, especie y cepa, ya que los efectos beneficiosos pueden diferir entre diferentes cepas de la misma especie. Además, no deben presentar virulencia alguna para el consumidor. Por lo tanto, los probióticos son organismos reconocidos como seguros (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) y con presunción cualificada de seguridad (QPS), por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es decir, tras su evaluación mediante pruebas, concluyen que la cepa microbiana de estudio, no genera problemas de seguridad y pueden estar destinados para el consumo.

Entre los más relevantes, se encuentran las bifidobacterias y las bacterias del ácido láctico (BAL), siendo los lactobacilos los más destacados. Entre los efectos beneficiosos de estos probióticos se incluye la inhibición de microorganismos patógenos en el intestino, producción de ácidos grasos de cadena corta, degradación de toxinas, y la modulación de la respuesta inmune (Rodrigues et al. 2020). Además de obtener resultados prometedores en la prevención del cáncer de colon, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple y Parkinson (Leta et al., 2021).

Sin embargo, para asegurar su viabilidad y que se cumplan sus efectos beneficiosos, su concentración en el momento del consumo, debe estar entre 10^6-10^7 UFC/g o mL (FAO/OMS, 2001). No obstante, la introducción y supervivencia de probióticos en alimentos está limitada por la matriz alimentaria: pH, concentración de oxígeno, aw, sólidos solubles, así como el tratamiento térmico y agitación durante la elaboración del alimento. A nivel fisiológico, son susceptibles al pH ácido del estómago y a la exposición de las sales biliares intestinales (Frakolaki et al., 2021). Por lo tanto, para asegurar la viabilidad y la correcta liberación de microorganismos en el intestino, se han desarrollado diferentes tecnologías de microencapsulación microbiana en matrices poliméricas. Las técnicas más utilizadas son: extrusión, emulsión, secado por aspersión, secado por aspersión a vacío ultrasónico, liofilización y gelificación enzimática entre otras (Liu et al. 2019). Consisten en aislar o recubrir a los microorganismos mediante procesos mecánicos o fisicoquímicos para que lleguen viables al final del tracto digestivo. El uso de una determinada técnica dependerá del compuesto que se desea encapsular, de las características físico-químicas del material utilizado como agente encapsulante y que la matriz polimérica utilizada presente propiedades protectoras contra pH ácidos y no sea citotóxica para que la integridad del microorganismo no pueda verse afectada. Entre las matrices de microencapsulación más utilizadas de probióticos se encuentra el alginato, por sus propiedades estabilizantes, espesantes y gelificantes. Es un heteropolisacárido lineal e hidrofílico procedente de algas marinas. Está formado por los monómeros del ácido α-L-gulurónico y el ácido β-D-manurónico responsables de la resistencia del gel. Es un material económico, no es tóxico, termoestable, de fácil uso y está aprobado como aditivo alimenticio (Wu y Zhang, 2018)

Entre las diferentes técnicas, destaca la encapsulación de extrusión por ser una técnica sencilla y viable económicamente (Rodrigues et al., 2020). La extrusión se basa en formar una solución hidrocoloide con alginato de sodio y el microorganismo a encapsular, extrusionando la solución formada con una jeringuilla y aguja mediante una presión constante sobre una solución de $CaCl_2$, donde se forma la

cápsula de manera instantánea e irreversible en contacto con el ion de calcio por desplazamiento de los iones de sodio del alginato. Según la concentración de alginato de sodio empleada se obtiene diferentes variaciones en la viscosidad del gel que pueden influir en el tamaño de las cápsulas (Chen et al., 2017).

No obstante, la técnica por extrusión con alginato de sodio utilizada para la microencapsulación de probióticos, presenta ciertas desventajas, ya que las cápsulas presentan una pared porosa, dando lugar a una baja retención de bacterias, así como la degradación del polímero tras una exposición prolongada a altas temperaturas y pH ácido. Para prevenir estos inconvenientes, se ofrecen alternativas como la creación de una capa múltiple que rodee la cápsula ayudando a preservar la viabilidad y retención del probiótico. En la formación de cápsulas con multi-polisacáridos, la inulina y el agar-agar pueden ser una alternativa en la monitorización de la supervivencia de probióticos (Zaeim et al. 2020). La inulina, es un prebiótico, que mejora la supervivencia del microorganismo durante el proceso de elaboración y digestión gastrointestinal. El agar-agar es un polisacárido compuesto por unidades monoméricas repetidas de agarobiosa, con gran capacidad gelificante, capacidad de unión con otras moléculas y tolerante a condiciones ácidas, y, por lo tanto, idóneo frente a la acidez estomacal (Valero y Frutos, 2015).

Aunque diferentes estudios han demostrado que la encapsulación con alginato favorece la viabilidad celular de *Lactobacillus* durante el procesado y tras someterse a condiciones gástricas (Dimitrellou et al., 2019), existen escasas investigaciones sobre la supervivencia de los probióticos sometidos a digestión *in vitro* utilizando diferentes matrices protectoras en su encapsulación.

De este modo, el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar cápsulas con alginato de sodio simples sin recubrimiento (CN) y cápsulas con recubrimiento doble capa (CM) para evaluar su efecto protector sobre la viabilidad de *L. plantarum* encapsulado frente al estrés secuencial del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y a condiciones de alta temperatura (50-80 ^{0}C). Además de analizar propiedades físico-químicas como actividad de agua, diámetro de la cápsula y capacidad de hinchamiento.

Material y Métodos

Probiótico y condiciones de cultivo

Lactobacillus plantarum (LP) CECT 220 se adquirió de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Para obtener un recuento microbiano inicial en torno a 10^{8} UFC/mL, se siguió el método según Valero y Frutos (2015). El microorganismo se resuspendió en 10 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid; Madrid, España) se incubó durante 24 h a 37 ^{0}C obteniendo así el preinóculo microbiano. Posteriormente, un 1% (v/v) de este preinóculo, se inoculó en 100 mL de caldo MRS y se incubó a 37 ^{0}C durante 24 h. Mediante centrifugación se separó la biomasa a 2000 x g durante 10 minutos a 4 ^{0}C (Centrigue C30P, B Braum Biotech International). Para eliminar el MRS residual, se lavó el sedimento obtenido en la centrifugación con tampón fosfato salino estéril (PBS) (Sigma, España) y se almacenó -80 ^{0}C en crioviables con 10% (v/v) de glicerol como crioprotector.

Método de encapsulación por extrusión

La solución de alginato se preparó con glicerol al 5% (p/v), alginato de sodio al 2% (p/v) y goma xantana al 0,15% (p/v) en agua. A continuación, la mezcla se homogeneizó en un ULTRA-TURRAX^{TM} (modelo T18 Basic) a 3000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió *L. plantarum*, a una concentración de 1:10 (cultivo microbiano: solución de alginato). La suspensión de alginato y el probiótico se cargó en una jeringa de 5 mL con una aguja de 25G x 16 mm. Posteriormente, la solución de alginato se dejó caer a una distancia de 5 cm sobre una solución 1 M de

$CaCl_2$ (Scharlau; Barcelona, España). Las microcápsulas una vez formadas se dejaron reposar en la solución de $CaCl_2$ bajo agitación constante de 100 rpm durante 30 minutos para su endurecimiento.

Recubrimiento doble capa de las cápsulas

La preparación del hidrocoloide protector se preparó con agar-agar e inulina al 1% (p/v), respectivamente. Posteriormente, el 50% de las cápsulas probióticas de alginato obtenidas con el método de extrusión, se sumergieron en dicha solución durante 30 minutos a 300 rpm. Una vez formada la matriz protectora, las cápsulas se lavaron con agua para retirar el exceso de la solución hidrocoloide protectora.

Viabilidad de la cepa microbiana

La viabilidad de *L.plantarum* se obtuvo mediante recuento en placa, diluyendo en 9 mL de agua de peptona estéril (Oxoid; España), 1 mL de LP libre en la solución de alginato de sodio o 1 g de cápsulas probióticas. El probiótico, se liberó de las cápsulas con ayuda de un homogeneizador de paletas (modelo BagMixer 400 W) durante 5 minutos. A continuación, se realizaron diluciones seriadas sembrando 0,1 mL en placas de MRS agar (Scharlau; España) y se incubaron en condiciones aeróbicas a 38 ^{0}C durante 48 h. Los resultados se expresaron en Log UFC/mL ó g^{-1} de microcápsulas.

Eficacia de la encapsulación

La eficiencia de encapsulación en los diferentes tipos de cápsulas (simple y doble capa), se calculó mediante la fórmula utilizada por Braber et al. (2020):

$$EE\ (\%) = [\text{Log } N / \text{Log } N_0] \times 100 \quad \text{(eq. 1)}$$

Siendo, Log N_0 el recuento obtenido del microorganismo sin encapsular (LP + alginato sódico) y Log N el microorganismo encapsulado. Los resultados se expresaron como Log UFC/mL.

Tolerancia de *L.plantarum* a la digestión gastrointestinal *in vitro*

Se estudió la supervivencia de LP durante la digestión gastrointestinal, siguiendo el método propuesto por Valero y Frutos (2017). La simulación de los jugos gástricos (SJG) se prepararon con una solución de PBS y 3 g/L de pepsina (Sigma; España) acidificando el medio con 1 M HCl (Panreac; España) hasta alcanzar un pH 2. Se agregaron 10 g de los diferentes tipos de cápsulas por separado, en dos vasos de precipitado con 250 mL de SJG incubándose durante 60 minutos a 37 ^{0}C y 150 rpm. Trascurrido este tiempo, se tomó 1 g de cada tipo de cápsulas y 1 mL de los respectivos medios de SJG para comprobar la viabilidad de LP siguiendo el punto 2.4. Para la simulación de la digestión intestinal (SJI), el pH de la solución SJG, se neutralizó con 1 M NaHCO3 (Panreac; España) para detener la reacción enzimática. Posteriormente, se añadió 1 g/L de pancreatina y 4,5 g/L de sales biliares (Sigma; España). Esta solución se mantuvo a 37 ^{0}C durante 60 minutos. Pasado el tiempo de SJI, se recogió 1 gramo de los diferentes tipos de cápsulas y de los respectivos medios de SJI. A continuación, estas muestras se sembraron en placas en MRS agar, diluyendo 1 mL de cada muestra en PBS o 1 g en el caso de las cápsulas, siguiendo el protocolo del punto 2.4.

Tratamiento térmico

La tolerancia de LP al tratamiento térmico, se evaluó sometiendo al microorganismo encapsulado y sin encapsular a diferentes temperaturas. Las diferentes cápsulas y el LP libre se introdujeron por separado en agua a 50 ºC y 80 ^{0}C en una proporción 1:10 (p/v) bajo una agitación constante de 200 rpm durante 1 y 5 minutos. Inmediatamente después, las cápsulas se atemperaron con agua fría para detener la actividad térmica. Una vez enfriadas, se cogió 1 g de las diferentes muestras o 1 mL de agua para comprobar la viabilidad de LP siguiendo el protocolo del punto 2.4.

Actividad de agua

La actividad de agua (aw) de las diferentes cápsulas se determinó mediante un medidor de actividad de agua (Novasina aw-Sprint TH500: Pfaffikon, Zurich, Suiza).

Morfología y tamaño de las microcápsulas

Se midió el diámetro de 20 cápsulas de cada tipo, con ayuda de un micrómetro calibrador digital eléctrico (Insize IP65, España) expresando las medidas en mm. La morfología superficial de las cápsulas se observó con un estereoscopio Leica MZ95 (Leica, España) antes y después de las diferentes fases de digestión gastrointestinal.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces y los resultados se expresaron como la media ± desviación típica. La comparación de medias se realizó mediante el paquete software SPSS v 21.0 (Inc., Chicago-Illinois-USA) utilizando un análisis de varianza bidireccional (ANOVA). Mediante la prueba de rango múltiple de Tukey se analizó las diferencias significativas ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

Supervivencia de *L. plantarum* en diferentes matrices protectoras durante la digestión *in vitro*

La supervivencia de *L. plantarum* antes de la exposición a condiciones gastrointestinales *in vitro,* no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes tipos de cápsulas siendo la concentración inicial de 8,31 y 8,34 Log UFC/g para CN y CM, respectivamente (figura 1). Tras el periodo de digestión gástrica, la viabilidad del probiótico en las CN disminuyó un 12,63 % con respecto a la concentración inicial. Al mismo tiempo, se observó la misma concentración de células viables dentro de las cápsulas y en el medio gástrico alcanzando una concentración de 7,26 y 7,17 Log UFC/g respetivamente. Esto pudo ser debido a la migración de LP hacía el medio gástrico causado por la elevada porosidad de las CN. Sin embargo, en cápsulas de doble capa, la viabilidad de *L. plantarum* no mostró diferencias significativas con respecto de la concentración inicial. Sin embargo, al comparar la presencia de LP en el medio gástrico, se observó que fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en las CN respecto de las CM, con una diferencia de 2,55 Log UFC/g entre ambos tipos de cápsulas. Por lo tanto, en condiciones de digestión gástrica, la supervivencia del probiótico en el interior de cápsulas con matriz protectora, fue mayor respecto de las CN (8,21 y 7,26 Log UFC/g, respectivamente). Por lo que, se puede afirmar que la matriz protectora permitió mantener la integridad estructural de la cápsula, evitando la liberación del probiótico al medio gástrico, como si ocurrió en cápsulas sin recubrimiento (CN). Del mismo modo, se observaron, resultados similares en investigaciones realizadas con *Bifidobacterium BB-12* donde tras la simulación gástrica, la tasa de supervivencia más alta de bifidobacterias se dio en aquellas microcápsulas cuya cubierta estaba enriquecida con prebióticos como inulina y oligofructosa en comparación con las células libres (Fritzen-Freire et al., 2013). En comparación con otros estudios, se confirmó que en cápsulas con solo alginato a pH 2 (condición estomacal) se produce un hinchamiento de las cápsulas, ya que bajo estas condiciones aumenta la hidrofobicidad y la porosidad del alginato de sodio, lo que conlleva a una disociación prematura de la cápsula y la liberación de la carga probiótica (Liu et al., 2019).

Después de la digestión intestinal, la viabilidad del probiótico en cápsulas normales disminuyó un 28 % ($p \leq 0,05$) con respecto a la viabilidad gástrica y 13 % respecto a la viabilidad obtenida en las cápsulas con recubrimiento. La pérdida de viabilidad total tras las condiciones intestinales fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en el interior de cápsulas normales con un 37,06 % mientras en cápsulas de doble capa se mantuvo el valor de pérdida de viabilidad del 13 %. Por lo tanto, la viabilidad en estas últimas fue mayor consiguiendo una liberación mayor y más controlada del probiótico al medio intestinal, alcanzando concentraciones igualitarias tanto en los jugos intestinales

simulados como en el interior de las cápsulas. Por lo tanto, se podría afirmar que la migración de LP al medio intestinal, ocurre al aumentar el pH (6,5- 7) provocando mayor difusión a través de los poros en la red del polímero tras condiciones intestinales (Muhammad et al., 2021), de manera que el probiótico llegaría al órgano diana pudiendo llegar a generar efectos beneficios en el hospedador. Por tanto, la supervivencia de LP en CM fue mayor que en CN, mostrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ambos tipos de cápsulas. Por lo tanto, el recubrimiento con agar-agar e inulina como matriz protectora consigue una alta supervivencia de *L. plantarum* tras la digestión *in vitro*. No obstante, en futuras investigaciones, se podría estudiar aumentar el tiempo de la digestión intestinal para comprobar el tiempo necesario en alcanzar la completa migración en el medio intestinal.

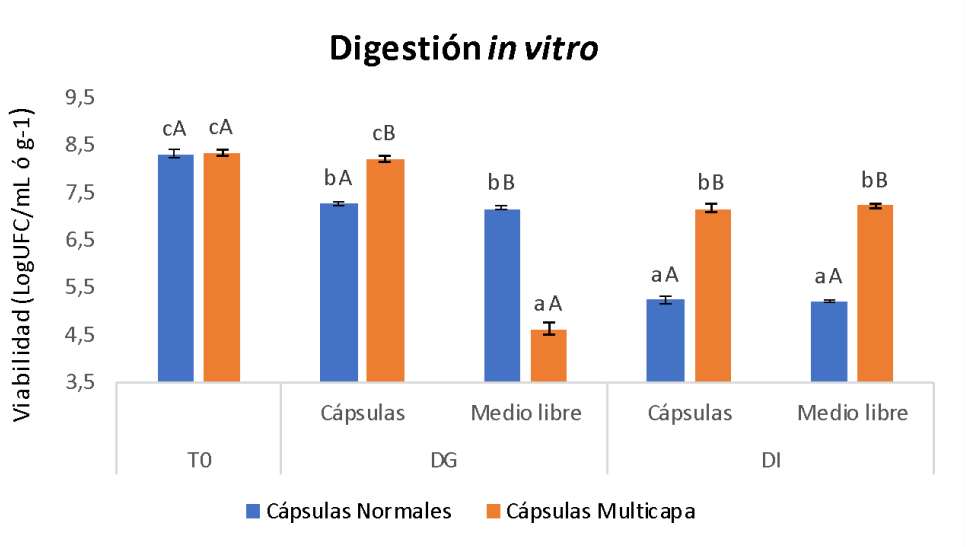


Figura 1. Viabilidad de L.plantarum en distintas matrices protectoras durante las diferentes fases de digestión in vitro. La desviación estándar se indica con las barras de error. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para el mismo tipo de cápsulas durante las diferentes fases de digestión gastrointestinal. Las letras mayúsculas manifiestan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos tipos de cápsulas para la misma fase de digestión gastrointestinal. T0: tiempo inicial, DG: digestión gástrica, DI: digestión intestinal

Tamaño y estructura de las cápsulas

En cuanto al tamaño de las cápsulas se observaron diferencias significativas en las cápsulas con recubrimiento donde se presentó inicialmente un tamaño significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en comparación con cápsulas sin envoltura (1,96 mm y 1,80 mm, respectivamente) (tabla 1). En estudios similares, con una concentración de alginato de sodio al 2% usando la técnica de extrusión, el tamaño promedio de las cápsulas con recubrimiento prebiótico (inulina o galactooligosacárido) fue mayor que las microcápsulas simples (Krasaekoopt y Watcharapoka, 2014). Por lo tanto, se puede afirmar que la adición de inulina y agar-agar aumentó el diámetro en las cápsulas de doble capa. Al comparar el tamaño de las cápsulas durante las diferentes fases de la digestión *in vitro*, se observó un aumento de diámetro en las diferentes cápsulas durante la digestión gástrica, donde las CN aumentaron significativamente su tamaño, pasando de 1,80 mm a 1,94 mm, mientras que en CM el aumento fue más significativo, pasando de 1,96 a 2,22 mm. De igual forma, ocurrió tras la digestión intestinal donde cápsulas normales y doble capa aumentaron significativamente ($p \leq 0,05$) su tamaño en un 22,6 % y 57 %, respectivamente al final del periodo de digestión. De manera general, conforme avanzaban

las fases de la digestión, se produjo un aumento significativo ($p \leq 0,05$) del diámetro en ambos tipos de cápsulas, alcanzando el mayor tamaño al finalizar la digestión intestinal. Este incremento de tamaño en las CM puede deberse a que la presencia de polisacáridos como la inulina y el agar- agar provoca una mayor absorción de agua, lo que provoca un mayor hinchamiento de la cápsula. En el caso de cápsulas sin recubrimiento, durante la exposición gástrica, se pierde parte de la integridad de la cápsula de tal forma, que se produce un aumento de solutos hacía el interior de la cápsula, aumentando así su tamaño (Amorós López, 2013). En estudios previos con *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2409 encapsulado con un 2% de alginato, afirman que la viabilidad de las células en las microcápsulas, es mayor a mayor tamaño de cápsulas, debido a que el aumento de la viscosidad forma un gel más denso y reticulado (Rather et al., 2017). No obstante, el tamaño y la estructura de las cápsulas está determinada en gran medida por la eficacia de encapsulación: el tamaño de la aguja, la concentración de alginato de sodio, la concentración de $CaCl_2$ y el método de microencapsulación utilizado (Valero y Frutos, 2015).

Tabla 1. Tamaño de los diferentes tipos de cápsulas en cada etapa de digestión in vitro[a].

	Diámetro (mm)		
	T0	**DG**	**DI**
CN	1,80 ± 0,14 aA	1,94 ± 0,11 bA	2,23 ± 0,14 cA
CM	1,96 ± 0,11 aB	2,22 ± 0,22 bB	2,79 ± 0,22 cB

[a] Los resultados se expresaron con la media ± desviación estándar. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para el mismo tipo de cápsula antes y después de la digestión y las letras mayúsculas diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre distintos tipos de cápsulas T0: tiempo inicial, DG: digestión gástrica, DI: digestión intestinal, CN: cápsulas simples y CM: cápsulas de doble capa.

Respecto a la apariencia de la superficie de las cápsulas (Figura 2), se pueden observar diferentes cambios. Tras la simulación gástrica, las cápsulas normales presentan una superficie irregular, rugosa, agrietada y con hendiduras. Esto puede ser debido a la pérdida de permeabilidad de la pared de las cápsulas y el aumento de la porosidad, a causa de los cambios de pH de las condiciones gastrointestinales (Amorós López, 2013). Sin embargo, en cápsulas con doble revestimiento se observó una superficie más compacta, continua y firme. Por este motivo, las cápsulas de doble capa protegen de manera más eficaz la viabilidad de las células probióticas dentro de la matriz durante el procesamiento (Rather et al., 2017).

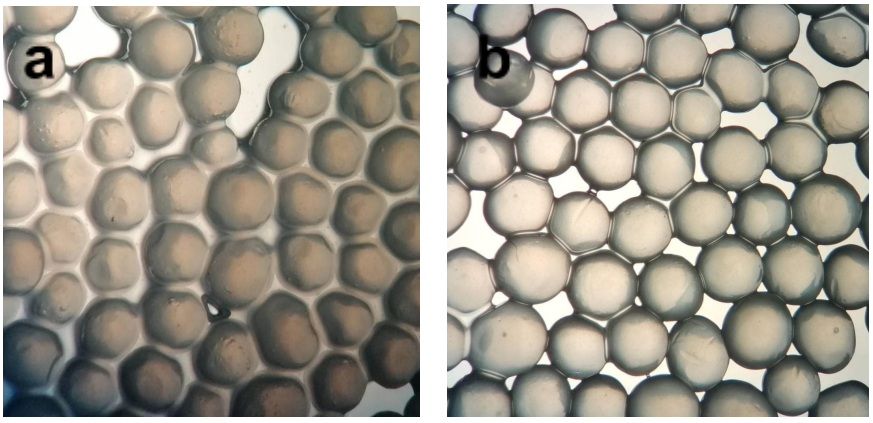


Figura 2. (a) Cápsulas simples y (b) cápsulas de doble capa después de la digestión in vitro

Viabilidad de *L.plantarum* libre y encapsulado a diferentes intervalos de tiempo y temperatura

Al someter a LP a diferentes intervalos de tiempo y temperatura tanto libre como encapsulado en CN y CM (Figura 3), se observó una disminución de la viabilidad celular significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en LP libre. Conforme aumenta el tiempo y la temperatura de exposición, la viabilidad de LP fue disminuyendo desde concentraciones iniciales de 8,31 Log UFC g^{-1} en CN y 8,34 Log UFC/g en CM hasta 7,27 Log UFC/g y 8,27 Log UFC/g respectivamente al minuto y 50 ºC llegando a no presentar viabilidad en las condiciones más extremas de tiempo y temperatura (80 ^{0}C y 5 minutos) en LP libre. Sin embargo, en cápsulas normales a los 5 minutos y 50 ºC, se observó una supervivencia de 7,22 Log UFC/g y 8,21 Log UFC/g en cápsulas de doble capa manteniendo la viabilidad sin diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al primer minuto de exposición térmica. De esta manera, durante 1 minuto a 80 º C, el mayor recuento de células vivas se observó en CM (8,03 Log UFC/g) seguido de CN (6,51 Log UFC/g) y por LP libre en el medio (4,87 Log UFC/mL). Sin embargo, cuando las cápsulas y el LP libre, se sometieron a una temperatura de 80 ºC durante 5 minutos, no se observó viabilidad en el microorganismo libre, aunque en ambos tipos de cápsulas se observó supervivencia probiótica. Sin embargo, fue significativamente menor en CN (5,06 Log UFC/g) respecto a CM (6,05 Log UFC/g). De este modo, se puede demostrar que las cápsulas con matriz protectora (inulina y agar-agar) ofrecen un efecto termoprotector significativamente mayor en comparación con cápsulas normales, ya que, al final del tratamiento térmico la mayor pérdida de viabilidad se dio en cápsulas normales con un 39,11 % respecto del 27,46 % en las cápsulas con envoltura protectora. Otros estudios, presentaron resultados simulares, donde cepas de *L. plantarum* microencapsuladas mediante secado por aspersión y recubiertas por polisacáridos de almidón resistente de patata obtuvieron mejores resultados en la capacidad de supervivencia durante el tratamiento térmico que cápsulas sin recubrimiento (Muhammad et al., 2017). Por lo tanto, la resistencia de LP a temperaturas elevadas podría hacer viable la introducción de este probiótico en bebidas o alimentos que deban someterse a procesos de tratamiento térmico.

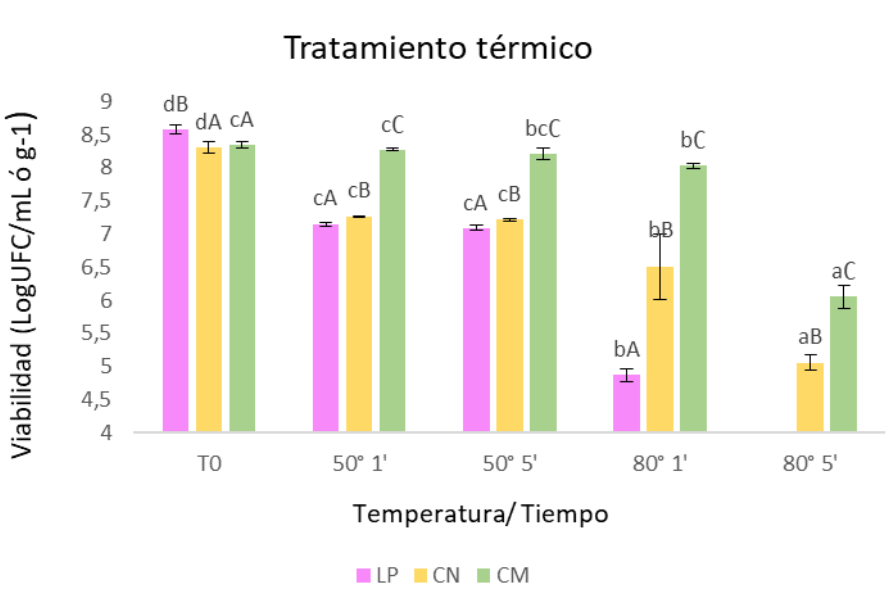


Figura 3. Supervivencia de L.plantatum durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas y tiempo. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para el mismo tipo de cápsula antes y después del tratamiento térmico y las letras mayúsculas diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre distintos tipos de cápsulas T0: tiempo inicial, LP: Lactobacillus plantarum libre, CN: cápsulas simples y CM: cápsulas doble capa.

Eficacia de encapsulación y actividad de agua

La actividad de agua (aw) está estrechamente ligada con la viabilidad de los probióticos, porque el contenido de humedad dentro de la cápsula es clave para conseguir buen rendimiento de encapsulación y, por lo tanto, una mejor supervivencia del microorganismo (Rather et al. 2017). Como se observa en la tabla 2, la aw no presenta diferencias significativas entre ambos tipos de cápsulas. Sin embargo, diversos estudios afirman que los recubrimientos de cápsulas con formulaciones que hacen uso de polisacáridos, influyen en la retención de humedad, debido a la composición de la matriz protectora aportando mayor actividad de agua en cápsulas de doble capa (Muhammad et al., 2017).

Respecto a la eficacia de encapsulación, se observó como la adición de inulina y agar-agar mejoró el rendimiento de encapsulación respecto de las cápsulas normales, siendo del 98% en CM frente al 85% en CN (Tabla 2). El recuento de LP antes de la encapsulación en las soluciones de alginato de sonido fue de 8,33 Log UFC/mL. Sin embargo, después de la encapsulación en CN, se observaron diferencias significativamente menores ($p \leq 0,05$) de 7,10 Log UFC/g con respecto a las obtenida en la solución de alginato antes de iniciar el proceso de encapsulación. Sin embargo, en CM no se observó diferencias significas ($p > 0,05$) en la viabilidad celular antes y después de la encapsulación. Por lo tanto, se podría afirmar que las cápsulas recubiertas con polisacáridos, ofrecen una mejor retención del microorganismo en el interior de las cápsulas. De la misma manera, en *Lactobacillus acidophilus KLDS* la eficacia de encapsulación más alta se dio en aquellas cápsulas recubiertas con polisacáridos de almidón resistente de maíz (95,80%) seguido de almidón de patata (94,30%), relacionando a su vez que a mayor eficacia de encapsulación mayor es la capacidad de resistencia celular frente a cambios de pH y temperatura (Muhammad et al., 2021).

Tabla 2. Parámetros físico-químicos de los diferentes tipos de cápsulas[a].

	Viabilidad[*]	EE (%)	Aw
T_0	8,33 ± 0,02 b	-	-
CN	7,10 ± 0,01 a	85% a	0,87 ± 0,01 a
CM	8,20 ± 0,03 b	98% b	0,88 ± 0,01 a

[a] Media y desviación estándar. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las diferentes cápsulas. [*] Log UFC/mL ó g. EE: eficacia de encapsulación, Aw: actividad de agua, T0: tiempo inicial, CN: cápsulas simples y CM: cápsulas de doble capa.

Conclusión

La eficacia de encapsulación estuvo influenciada por las diferentes matrices de protección utilizadas para encapsular a *L.plantarum*, mostrando mejores resultados las cápsulas de doble capa. Al final de la digestión gastrointestinal la supervivencia del probiótico en cápsulas con agar-agar e inulina fue mayor al mínimo recomendado en el momento del consumo (10^6 UFC/g). Sin embargo, en cápsulas sin recubrimiento la viabilidad del probiótico disminuyó significativamente tras la digestión gástrica al producirse la liberación probiótica al medio gástrico de manera prematura. El tamaño de las cápsulas aumentó al final de la simulación gastrointestinal, observando el mayor diámetro en cápsulas con recubrimiento. Al final del tratamiento térmico (50 y 80 ºC), las cápsulas recubiertas de inulina y agar-agar mostraron efecto termoprotector al obtener el mayor recuento celular frente a cápsulas sin recubrimiento. Por lo tanto, el recubrimiento con agar-agar e inulina mostró ser un buen método para mejorar la supervivencia de *L.plantarum* tras condiciones gástricas y térmicas. Se espera que la encapsulación de probióticos con matriz multi-polisacárida pueda ofrecer propiedades estabilizantes y termoprotectoras en el desarrollo de alimentos funcionales.

Bibliografía

Amorós López, D., 2013. Efecto del almidón en la viabilidad gastrointestinal de *Lactobacillus Acidophilus* en biosoportes de alginato/almidón. http://doi.org/10651/19091

Braber, N. V., Vergara, L. D., Rossi, Y. E., Aminahuel, C. A., Mauri, A. N., Cavaglieri, L. R., & Montenegro, M. A., 2020. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, *118*, 108844. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108844

Chen, J., Wang, Q., Liu, C. M., & Gong, J., 2017. Issues deserve attention in encapsulating probiotics: Critical review of existing literature. Critical reviews in food science and nutrition, 57(6), 1228-1238. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977991

Dimitrellou, D., Kandylis, P., Lević, S., Petrović, T., Ivanović, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y., 2019. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *LWT*, *116*, 108501. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108501.

European Food Safety Authority (EFSA)., 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA journal*, *3*(6), 226. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.226.

FAO/WHO., 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.

Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C., 2021. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. Critical reviews in food science and nutrition, 61(9), 1515-1536.https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761773

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B., & Amboni, R. D., 2013. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. LWT-Food Science and Technology, 50(1), 39-44. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037

Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S., 2014. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. LWT-Food Science and Technology, 57(2), 761-766. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037

Leta, V., Chaudhuri, K. R., Milner, O., Chung-Faye, G., Metta, V., Pariante, C. M., & Borsini, A., 2021. Neurogenic and anti-inflammatory effects of probiotics in Parkinson's disease: a systematic review of preclinical and clinical evidence. Brain, Behavior, and Immunity. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.07.026.

Liu, H., Cui, S. W., Chen, M., Li, Y., Liang, R., Xu, F., & Zhong, F., 2019. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: a review. Critical reviews in food science and nutrition, 59(17), 2863-2878. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1377684

Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G. C., Tian, H., & Bian, X., 2017. Integration of polysaccharide-thermoprotectant formulations for microencapsulation of Lactobacillus plantarum, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. *Food hydrocolloids*, *66*, 286-295. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.040

Muhammad, Z., Ramzan, R., Zhang, R., & Zhang, M., 2021. Resistant Starch-Based Edible Coating Composites for Spray-Dried Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*, Comparative Assessment of Thermal Protection, In Vitro Digestion and Physicochemical Characteristics. *Coatings*, *11*(5), 587. https://doi.org/10.3390/coatings11050587

Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M., 2017. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of Lactobacillus plantarum NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT-Food Science and Technology*, *83*, 50-58. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.036

Reque, P. M., & Brandelli, A., 2021. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022

Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H., 2020. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications-a narrative review. *Food Res. Int*, *137*(109682.10), 1016. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682.

Santini, A., Cammarata, S. M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore, G. C., Pani, L., & Novellino, E., 2018. Nutraceuticals: Opening the debate for a regulatory framework. *British journal of clinical pharmacology*, *84*(4), 659-672. https://doi.org/10.1111/bcp.13496

Valero-Cases, E., & Frutos, M. J., 2015. Effect of different types of encapsulations on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. *LWT-Food science and technology*, *64*(2), 824-828. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.049

Valero-Cases, E., & Frutos, M. J., 2017. Development of prebiotic nectars and juices as potential substrates for *Lactobacillus acidophilus:* Special reference to physicochemical characterization and consumer acceptability during storage. *LWT-Food Science and Technology*, *81*, 136-143. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.047

Wu, Y., & Zhang, G., 2018. Synbiotic encapsulation of probiotic Latobacillus plantarum by alginate-arabinoxylan composite microspheres. *LWT*, *93*, 135-141. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.034

Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., Kadkhodaee, R., Liu, W., & Tromp, R. H., 2020. Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electro-hydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation. *Food Structure*, *25*, 100147. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100147

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Estudio del grado de implementación de *Clean Label* en alimentos de gran consumo en España: propuestas de mejora

N. Jiménez-Redondo, M. Cano-Lamadrid y J. M. Valverde

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. de Beniel km 3,2. Orihuela, Alicante. 03312. E-mail: nuria.jimenez01@alu.umh.es; marina.canol@umh.es ; jm.valverde@umh.es

Resumen

Existe una tendencia a un etiquetado claro y con menor presencia de aditivos en los alimentos y así surge el concepto *Clean Label* el cual representa la respuesta de la industria alimentaria a esta demanda. En la actualidad, no hay legislación sobre *Clean Label*, ni existe una definición ampliamente aceptada a nivel mundial. Sin embargo, los consumidores exigen información clara en las etiquetas de los alimentos, y las empresas alimentarias ya están atendiendo dicha demanda dentro de un marco no regulado. Este trabajo tiene por objetivo estudiar el grado de implementación del concepto *Clean Label* y ofrecer propuestas de mejora a las formulaciones actuales. Para ello se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica además de la elaboración de una lista de comprobación para obtener datos reales y realizar propuestas de mejora en aquellos grupos donde esté poco implantado, indicando alternativas para sustituir los aditivos que contengan en su formulación por otros ingredientes que puedan ofrecer la misma función tecnológica.

Palabras clave: etiquetado, ingredientes, aditivos, libre de y *check-list*.

Study of the degree of implementation of Clean Label in consumer foods in Spain: proposal for improvement

Abstract

There is a tendency of clear labelling and less presence of additives in food. Thereby, the Clean Label concept emerges, representing the response of the food industry to this demand. Nowadays, there is no legislation about Clean Label nor a widely accepted definition. However, consumers demand clear information on food labels, and food companies are working on this demand within an unregulated framework. The objective of this work is to study the degree of Implementation of the Clean Label concept and offer proposals for improvement to current formulations. Also, a literature review was carried out joint the preparation of a check-list. The aim of this check-list is to obtain real data and make proposals for those groups in which it is not implemented enough. Alternatives with the same techno-functional for replacement were proposed.

Keywords: labelled, ingredients, additives, properties and check-list.

Concepto *Clean Label*

La definición de *Clean Label* es compleja ya que no existe una definición oficial ni regulada del concepto pero aunque no está definido por legislación y tiene diferentes interpretaciones, hay 2 conceptos que a menudo se incluyen en las definiciones no oficiales y estos son ‘’natural’’ y ‘’orgánico’’ y la definición de estos sí que se encuentra regulada por la ISO/TS 19657 y por la Nueva Regulación (EU) 2018/848 respectivamente (Ingredion, 2020). Además se incluyen otros términos como ‘’local’’, ‘’sostenible’’, ‘’sin aditivos’’, ‘’sin OMG’’, ‘’sin azúcares añadidos’’…

Debido a que no se encuentra regulada su definición se ha consultado bibliografía y se han obtenido diferentes definiciones del concepto (Borra, 2010; Rozin *et al.*, 2012; Asioli *et al.*, 2017). Entre todas ellas se detalla la definición realizada recientemente por Ingredion (2020), dividiéndose en 7 grupos las cualidades del producto que los consumidores esperan de un alimento *Clean Label*:

- **Ingredientes simples y naturales**: en la lista de ingredientes esperan encontrar que el producto haya sido elaborado con ingredientes que es esperable que aparezcan en el etiquetado en ese tipo de productos y que les son familiares.
- **Etiqueta limpia**: etiquetas libres de aditivos.
- **Orgánico**: 95 % regulado y 100 % certificado.
- **Productos químicos**: el consumidor espera un alimento con pocos o ningún ingrediente sintético y busca que estos hayan sido reemplazados por otras alternativas naturales.
- **Origen**: materias primas de procedencia local y sostenibles para el medio ambiente.
- **Organismos modificados genéticamente (OMG)**: que no se encuentren OMG entre los ingredientes.

Clean Label Project

Existe una norma privada estadounidense llamada *Clean Label Project* (2021) que es una organización sin ánimo de lucro y tiene como objetivo asegurar que el etiquetado de los alimentos y de otros productos de consumo sea transparente y fiable.

Clean Label Project tiene diferentes objetivos entre los que se encuentran:

1. Facilitar una herramienta mediante la cual, siguiendo unos criterios, se pueda identificar, evaluar y maximizar la ‘’pureza’’ de los productos tanto para productores, como para proveedores, fabricantes…
2. Facilitar a los fabricantes una vía con la que ofrecer este compromiso a los consumidores.
3. Satisfacer la creciente demanda de transparencia de los consumidores a través de una solución de mercado que está respaldada por evidencia científica.
4. Proporcionar seguridad y confianza a los consumidores sin tener en cuenta las campañas de marketing que giran alrededor de los productos.
5. Crear un estándar con los productos químicos de interés y los requisitos de prueba y muestreo de contaminantes industriales y ambientales.

El alcance de la norma y por lo tanto aquellos que pueden solicitar su certificación son productores, fabricantes, cofabricantes, propietarios de marcas y minoristas.

Los alimentos se pueden agrupar teniendo en cuenta diferentes consideraciones como su sistema de producción que puede ser industrial, artesanal, globalizado, ecológico, local o pertenecer a una denominación de origen protegida o a una indicación geográfica protegida.

Otra forma de agrupar los alimentos es por el origen de las materias primas principales que lo componen y esta ha sido la forma elegida para agrupar los alimentos que serán analizados en este trabajo y que según el Informe de Consumo Alimentario en España de 2019 son de gran consumo en España.

Según esta clasificación tendríamos los siguientes grupos de alimentos: productos lácteos, productos de desayuno, zumos y néctares y bebidas vegetales.

El consumo per cápita de productos lácteos es de 108,2 kg al año, 1,3 % menos respecto al año anterior (2018) y el gasto por persona y año es de 180,9 €, 0,2 € menos que en 2018. Esta categoría es muy importante y representa el 12,0 % del dinero total que se destina en España a hacer la compra de alimentación y bebidas (Informe de Consumo Alimentario en España, 2019).

Dentro del grupo de productos de desayuno el consumo de cereales disminuyó 1,5 % tanto en volumen como en valor y una de las causas de esta disminución puede ser el aumento del precio medio del producto en 0,5 %. Por el contrario, el consumo de galletas aumentó 1,2 % en volumen en 2019 y 1,9 % en valor y la diferencia se debe a que el precio medio de estas también aumentó (Informe de Consumo Alimentario en España, 2019).

En la categoría de zumos y néctares el consumo disminuyó 5,4 % en volumen y 6,0 % en valor y además sufrió una disminución del precio medio. Las familias españolas dedican el 0,6 % del presupuesto de la compra a este tipo de productos y el consumo per cápita es de 8,1 litros por persona y año (Informe de Consumo Alimentario en España, 2019).

Según datos del MAPAMA (2018) las bebidas vegetales cada vez tienen más cuota de mercado en España y en el año 2018 se consumieron 230 691,6 litros de estas bebidas, es decir, 5,0 litros por persona y año.

Materiales y Métodos

Caracterización de *Clean Label*

Analizando las diferentes definiciones de *Clean Label* extraídas de la bibliografía se ha diseñado una *check-list* donde se han tenido en cuenta diferentes ítems que caracterizan a este tipo de productos. Se creó una *check-list* general con la que se puede evaluar cualquier tipo de alimento y esta lista general se dividió en diferentes listas a las que se le añadieron ítems específicos del grupo de alimentos a analizar para hacer un análisis más exhaustivo de cada grupo por separado. En la Tabla 1 se muestra la *check-list* general para el análisis del etiquetado y a partir del ítem 16 y resaltados en negrita se observan los ítems específicos para los diferentes grupos y la codificación de cada uno que aparecerá en las tablas de resultados. Siendo los ítems 16 y 17 específico para el grupo de productos lácteos, el 18 para los productos de desayuno, el 19 para los zumos y néctares de fruta y el 20 para las bebidas vegetales.

Tabla 1. *Check-list* elaborada para el análisis de etiquetado de alimentos específicos *Clean Label* y codificación de cada uno de los ítems a tener en cuenta.

Ítems a evaluar	Código
Presencia de aditivos (indicar nº)	Ítem 1 (I1)
Resaltado el origen nacional	Ítem 2 (I2)
Logo o declaración sostenible	Ítem 3 (I3)
≤ 5 ingredientes	Ítem 4 (I4)
Presencia de alérgenos	Ítem 5 (I5)
Etiquetado sencillo (nº de dibujos, nº de declaraciones…)	Ítem 6 (I6)
Contiene organismos modificados genéticamente (OMG)	Ítem 7 (I7)
Natural	Ítem 8 (I8)
Declaraciones nutricionales	Ítem 9 (I9)
Declaraciones saludables	Ítem 10 (I10)
Mención SIN (alérgenos, aditivos, lactosa, gluten, azúcares añadidos…)	Ítem 11 (I11)
Vegano o vegetariano	Ítem 12 (I12)
Ecológico/BIO	Ítem 13 (I13)
DOP/IGP	Ítem 14 (I14)
Responsabilidad social	Ítem 15 (I15)
Bienestar animal	**Ítem 16 (I16)**
SGS (gestión de servicios agrarios y de apoyo a la ganadería familiar)	**Ítem 17 (I17)**
Remarcado tipo de aceite/sin aceite de…	**Ítem 18 (I18)**
100 % fruta	**Ítem 19 (I19)**
100 % vegetal	**Ítem 20 (I20)**

Análisis de etiquetado

Para el análisis de etiquetado se ha visitado un supermercado ubicado en Orihuela (Alicante) y se han observado etiquetas de diferentes grupos de alimentos de todas las marcas comerciales disponibles en el mismo para así poder comparar entre ellos cómo de implantado está el concepto *Clean Label*.

Las familias de alimentos seleccionadas para el análisis de etiquetado son productos lácteos con 36 muestras de leche, 18 de yogures y otras leches fermentadas, 16 de quesos y 16 de postres lácteos, productos de desayuno (cereales de desayuno, galletas, etc…) con 50 muestras, zumos de frutas y néctares con 60 muestras, bebidas vegetales y productos fermentados elaborados a partir de estas con 18 muestras y productos para alimentación infantil como purés o leches de continuación con 25 muestras.

En general, la valoración de cada ítem es ‘’SÍ’’ o ‘’NO’’, pero hay algunas excepciones como es en el I1 que ha sido valorado con el número de aditivos que contiene el producto, el I9 e I10 donde se indica de forma codificada las declaraciones nutricionales y saludables respectivamente y por último, en el I11 se indica cuáles son las menciones del tipo ‘’sin…’’ que aparecen.

Alternativas a determinados aditivos

Teniendo en cuenta la función tecnológica de determinados aditivos que pueden tener alguna problemática de uso y basándonos en la bibliografía, se van a proponer ingredientes como alternativas a estos que puedan ofrecer la misma función tecnológica y contribuyan a aumentar el grado de implementación de *Clean Label*.

Los aditivos alimentarios se pueden dividir en 3 grupos (Ingredion, 2020) basándonos en si estos son bien aceptados por los consumidores, tolerados o limitados y en la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de los diferentes grupos.

Tabla 2. Aditivos aceptados, tolerados y limitados por los consumidores.

Aceptados	Tolerados	Limitados
Aromas naturales	Extracto de levadura	Goma guar
Colorantes naturales	Ácido ascórbico	Maltodextrina
Azúcar y glucosa	Sirope de maíz	Glutamato monosódico
Aceites vegetales	Pectinas	Goma xantana
Almidón de patata	Proteína de suero de leche	Grasas hidrogenadas
Almidón	Lecitina	Carragenano
Almidón de maíz	Fibra de patata	Mono y diglicéridos de ácidos grasos
Gelatina	Aromas artificiales	Caseinatos
Proteína de soja	Colorantes artificiales	Celulosa microcristalina
Almidón de arroz	Almidón modificado	Carboximetilcelulosa sódica
Conservantes	Almidón de tapioca	Hidroxipropilmetilcelulosa

Fuente: Ingredion, 2020.

Resultados y Discusión

Grado de implantación de *Clean Label* en los alimentos estudiados

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se ha calculado (Tabla 3) el % de ‘’SÍ’’ de cada uno de los ítems excepto de I1 donde se muestra el rango de número de aditivos que contienen los productos en su formulación por grupos de alimentos; de I5 e I7 se ha calculado el % de ‘’NO’’ ya que lo que busca el consumidor en un alimento *Clean Label* es que no contenga alérgenos en su formulación ni OMG; para I9, I10 e I11 se muestra el rango de declaraciones nutricionales, saludables y ‘’sin…’’ respectivamente, que contienen los alimentos seleccionados.

Por ser una categoría muy amplia y con productos diferentes entre ellos, el grupo de productos lácteos ha sido dividido en 4 subgrupos siendo PL1 leches, PL2 yogures y otras leches fermentadas, PL3 quesos y PL4 postres lácteos.

Tabla 3. Grado de implantación de cada uno de los ítems Clean Label por grupos de alimentos.

	PL1 n = 36	PL2 n = 18	PL3 n = 16	PL4 n = 16	PD n = 50	Z n = 60	BV n = 18	AI n = 25
I1	0-5	0-6	0-6	0-10	0-8	0-6	0-7	0-4
I2	50 %	6 %	0 %	0 %	6 %	7 %	22 %	16 %
I3	81 %	11 %	0 %	0 %	26 %	32 %	44 %	48 %
I4	67 %	17 %	69 %	6 %	8 %	38 %	22 %	24 %
I5	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	75 %	6 %	32 %
I6	100 %	94 %	100 %	19 %	52 %	97 %	100 %	72 %
I7	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
I8	17 %	28 %	6 %	0 %	6 %	7 %	17 %	24 %
I9	0-3	0-3	0-1	0	0-4	0-3	0-6	0-5
I10	0-2	0-1	0	0	0-3	0-1	0	0-4
I11	0-3	0-5	0-2	0-3	0-4	0-3	0-4	0-6
I12	0 %	0 %	0 %	0 %	24 %	7 %	67 %	0 %
I13	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	8 %
I14	0 %	0 %	37,5 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
I15	39 %	6 %	0 %	0 %	0 %	0 %	6 %	0 %
I16	19 %	6 %	0 %	0 %	-	-	-	-
I17	19 %	0 %	0 %	0 %	-	-	-	-
I18	-	-	-	-	62 %	-	-	-
I19	-	-	-	-	-	18 %	-	-
I20	-	-	-	-	-	-	83 %	-

PL: productos lácteos; PD: productos de desayuno; Z: zumos y néctares; BV: bebidas vegetales; AI: alimentación infantil

- **Productos lácteos**

Del primer grupo de productos lácteos formado por leches, uno de los resultados a resaltar es el remarcado origen nacional de la materia prima (I2), en todos los productos lácteos aparece el origen de la misma ya que forma parte de la información obligatoria de la etiqueta en este tipo de productos pero además, en el 50 % de las muestras de leche el origen aparecía resaltado y remarcado en una zona muy visible y con un diseño atractivo para el consumidor lo que también indica indirectamente que es un producto más sostenible por ser de producción local. Relacionado con el ítem anterior, en el 81 % de los envases de leche se indicaba que la producción de las mismas es sostenible o hacían alusión a alguna declaración o logo que lo indicara (I3).

Por otra parte, uno de los ítems a resaltar con menor % serían los alérgenos (I5), todas las muestras del grupo contienen ya que la leche por sí sola es un alérgeno de obligada declaración. La declaración de ‘’vegano o vegetariano’’ (I12) no aparece en ninguna de las muestras a pesar de que todas son productos aptos para vegetarianos.

Del segundo grupo de productos lácteos formado por yogures y otras leches fermentadas uno de los ítems a tener en cuenta de forma positiva es el etiquetado sencillo (I6), en general es así aunque en determinadas muestras la cantidad de dibujos e indicaciones era excesiva haciendo que no se pudiera visualizar de forma correcta la información obligatoria. Otro ítem a destacar es la declaración ‘’natural’’ ya que la definición de esta sí que se encuentra regulada y, en este caso, 1 de cada 3 muestras la contenía.

En cuanto a los resultados menos positivos destaca la ausencia de declaraciones sostenibles (I3) y relacionado con esta también el déficit de afirmaciones donde se confirme el bienestar animal (I16) o la ayuda a familias ganaderas (I17).

Del tercer grupo de productos lácteos formado por quesos que estos contuvieran 5 o menos ingredientes (I4) es un aspecto positivo a destacar ya que, en general, no son necesarios más ingredientes para la elaboración de los mismos y también la presencia de muestras con DOP/IGP (I14) que aunque son menos de la mitad de las muestras de este tipo, en este grupo es en el único en el que destaca este ítem. De igual forma que en las leches fermentadas, en ninguna de las muestras de queso aparecen declaraciones relativas al bienestar animal (I16), ni con el apoyo a las familias ganaderas (I17).

Por último, del grupo de productos lácteos se encuentran los postres lácteos que son productos con listas largas de ingredientes (I4) y con hasta 10 aditivos en sus formulaciones (I1) pero, sin embargo, en su etiquetado aparecen una gran cantidad de declaraciones nutricionales (I9), saludables (I10) y “sin…” (I11).

- **Productos de desayuno**

En los productos de desayuno se observa una situación similar a la de los postres lácteos, en general, son productos con listas de ingredientes muy largas (I4) entre los que se encuentran una gran cantidad de aditivos (I1) pero en su etiquetado se hacen múltiples declaraciones tanto nutricionales (I9), de salud (I10), como del tipo “sin…” (I11) por lo que ofrecen una mejor imagen al consumidor.

- **Zumos de frutas y néctares**

En los resultados obtenidos del análisis de las muestras de zumos y néctares que alrededor del 40 % de

las muestras contienen 5 o menos ingredientes en su composición (I4) y hay otras muestras que contienen más ingredientes debido a que en su composición se encuentran zumos de diferentes frutas combinados. Otro resultado positivo es que en el 75 % de las muestras, es decir, 3 de cada 4 productos del grupo no contiene alérgenos (I5) de obligada declaración. Como resultados negativos se observa que en solo el 7 % de las muestras aparece remarcado que los ingredientes son de origen local (I2) y únicamente en el 7 % de los zumos se indica que este es un producto natural (I8).

- **Bebidas vegetales y productos fermentados elaborados a partir de bebidas vegetales**

En el análisis del etiquetado de las bebidas vegetales los dos ítems que han obtenido un mayor grado de implementación están relacionados entre sí ya que uno de ellos es la mención ‘’vegetariano o vegano’’ (I12) y el otro es el ítem específico para este tipo de alimentos ‘’100 % vegetal’’ (I20). En cuanto a los que menor puntuación han obtenido se encuentran los alérgenos (I5) ya que la mayoría están elaborados con soja o con frutos secos y ambos son alérgenos de obligada declaración y el otro ítem a mencionar es que en ninguna de las muestras se encontraron declaraciones de salud (I10).

- **Alimentación infantil**

Tabla 4. Ingredientes *no Clean Label,* función de estos y alternativas *Clean Label.*

Ingredientes no *Clean Label*	**Función**	**Alternativas**
Mono y diglicéridos de ácidos grasos	Emulsionante, estabilizante	Chía, almidón, linaza
Grasas hidrogenadas	Recubrimiento, textura	Grasas interesterificadas
Goma guar	Textura, emulsionante, estabilizador	Cáscara de semilla de Psyllium
Maltodextrinas	Textura, emulsionante, estabilizador	Pectinas
Glutamato monosódico	Potenciador del sabor	Soja, sal
Caseinatos	Recubrimiento comestible	Aislado de suero de leche y proteínas de soja
Azúcar	Edulcorante, textura	Dátil, achicoria, agave
Carragenano	Textura, estabilizante	Konjac, fibra de avena, lecitina de girasol
Almidones modificados	Espesante, estabilizante	Almidones nativos funcionales
Jarabe de maíz con alto contenido en fructosa	Edulcorante	Miel o sirope de agave
Caramelo	Colorante	Azúcar caramelizado, polvo de zumo de manzana
Glicerol	Humectante, portador	Zumo de frutas, dextrina de arroz
Ácidos orgánicos	Antioxidante, acidulante, aromatizante	Zumos de frutas y concentrados
Celulosa (MCC, CMC, HPMC)	Textura, emulsificante, estabilizante	Fibras cítricas
Nitratos inorgánicos	Inhibidor de bacterias, colorante, saborizante, conservante	Polvo de ajo

Fuente: Cano-Lamadrid et al., 2021. The Age of Clean Label Foods.

Para finalizar con el último grupo de alimentos que son los correspondientes a la alimentación infantil, cabe señalar que estos son los que menos aditivos tienen en su composición (I1) y los que más declaraciones del tipo ‘’sin…’’ (I11) en su etiquetado en comparación con el resto de grupos. Por otra

parte, los ítems que menos se han encontrado son las declaraciones o logos haciendo referencia a que sus ingredientes son de origen local (I2) y naturales (I8), dos aspectos a tener en cuenta para comprar este tipo de alimentos por el grupo de población al que van dirigidos.

Adaptación de aditivos a *Clean Label*

Algunos de los aditivos que menos aceptación tienen entre los consumidores, considerando su función tecnológica, se pueden sustituir por ingredientes que no sean aditivos para así aumentar el grado de *Clean Label* de dichos productos siempre y cuando se mantenga la inocuidad y las propiedades tecnológicas adecuadas para que el alimento sea seguro y aceptado y en la Tabla 4 se pueden observar algunas de estas alternativas.

- **Productos lácteos**

Dentro del grupo de los productos lácteos los que contienen mayor cantidad de aditivos son los postres lácteos y concretamente son aditivos con función espesante y emulsionante ya que es necesario algún ingrediente que le aporte la textura característica de los mismos. Observando las etiquetas analizadas es habitual encontrar entre la lista de ingredientes mono y diglicéridos de ácidos grasos, goma guar, carragenanos o almidones modificados y estos podrían ser sustituidos por algún tipo de almidón nativo, por la cáscara de semilla de *Psyllium* o por algún tipo de fibra, entre otros, que realizarían la misma función tecnológica que los aditivos mencionados.

- **Productos de desayuno**

Algunos de los ingredientes calificados como ingredientes no *Clean Label* que aparecen a menudo en el etiquetado de este tipo de productos son mono y diglicéridos de ácidos como estabilizantes, azúcar para aportar el dulzor característico de este tipo de productos además de textura, caramelo como colorante, entre otros. El azúcar podría ser sustituida por dátiles que también aportan dulzor pero sin aportar azúcares libres además de textura, como colorante se podría utilizar zumo de manzana en polvo y aportaría un color parecido al del caramelo y los mono y diglicéridos de ácidos grasos por almidones nativos funcionales.

- **Zumos de frutas y néctares**

Los principales aditivos que aparecen en las formulaciones de los zumos y los néctares son antioxidantes para evitar que los componentes que son fácilmente susceptibles de oxidarse no lo hagan y para obtener dicha finalidad se podrían utilizar concentrados de zumos cítricos que contienen de forma natural dichos ácidos y por lo tanto podrían desempeñar la misma función.

- **Bebidas vegetales y productos fermentados elaborados a partir de bebidas vegetales**

Entre la lista de ingredientes de las bebidas vegetales analizadas los aditivos que aparecen como más frecuencia son gomas que tienen función estabilizante como la goma guar, la goma gellan, la goma garrofín o la goma xantana. Estos aditivos mejoran la viscosidad del producto y lo hace más atractivo para el consumidor, pero también en ciertos productos de este tipo en su formulación no contienen ningún tipo de aditivo por lo que sería posible prescindir de ellos o utilizar otros que sí fueran *Clean Label* como almidones nativos.

- **Alimentación infantil**

En alimentación infantil, en general, se emplean muy pocos aditivos para la elaboración de los productos, pero en algunos de ellos como en las leches para niños a partir de un año pueden contener algunos con función estabilizante como los carragenanos que podrían ser sustituidos por alguna fibra vegetal como la de avena.

1. Aunque hay muchos alimentos en concreto que sí cumplen con las definiciones de *Clean Label* si se tiene en cuenta el conjunto de alimentos que forman cada grupo de alimentos son necesarios algunos cambios para aumentar el grado de implantación del concepto.

2. Los productos de alimentación infantil son los que menos aditivos contienen en su composición y más declaraciones en su etiquetado, por lo que es el grupo donde más implantado está.

3. No todos los aditivos son fácilmente sustituibles por ingredientes *Clean Label*.

4. El grupo donde más declaraciones relacionadas con la sostenibilidad es en la leche.

5. En los yogures la declaración más frecuentes es la de ‘’natural’’.

6. En ninguna de las muestras analizadas se han encontrado OMG en su lista de ingredientes.

7. Las tendencias del mercado van hacia etiquetados más sencillos y fáciles de entender por el consumidor.

Bibliografía

Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T. y Varela, P. (2017). Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. Food Research International, 99, 58-71. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022

Borra S. Clean food labeling & sustainability benefit claims: What do consumers want? What are the legal requirements? What if compliance is not enough? Annual Meeting, Institute of Food Technologists; July 17-20; Chicago, III 2010.

Cano-Lamadrid, M., Lipan, L., Valverde, J.M., Carbonell-Barrachina, Á.A., Sendra, E. (waiting 2021). *The Age of Clean Label Foods*. Springer.

Clean Label Project. Code of Practice: Certificación. (2020). Recuperado el 17/04/2021 de https://cleanlabelproject.org/wp-content/uploads/CLP_Code-of-Practice_Certification-v3-5-24-2021-2.pdf

Clean Label Project. The consumer standard for food and consumer producto quality and safety. (2020). Recuperado el 17/04/201 de https://cleanlabelproject.org/

Ingredion (2020). The Clean Label Guide. Recuperado el 29/06/2021, de https://emea.ingredion.com/Campaign/Clean-Label-Guide.html

MAPAMA. Datos de consumo de bebidas vegetales. (2018).

Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. (2019). Informe de Consumo Alimentario en España. Recuperado de https://www.mapa.gob.es/images/es/informe2019_v2_tcm30-540250.pdf

Rozin, P., Fischler, C. y Shields-Argelès, C. (2012). European and American perspectives on the meaning of natural. Appetite, 59(2), 448-455. https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.06.001

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Elaboración de cerveza artesana sin alcohol enriquecida funcionalmente con brotes de brócoli ecológico

J. Gerth, M. J. Giménez, P. J. Zapata

Dept. Tecnología Agroalimentaria. EPSO, Universidad Miguel Hernández. Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante. e-mail: jumano.gerth@goumh.umh.es

Resumen

El mercado de la cerveza artesana ha crecido de forma significativa durante los últimos años en muchos países del mundo. Los consumidores exigen más variedad y calidad, así como productos más saludables que puedan contribuir al bienestar humano. En este sentido, el uso de nuevos ingredientes que confieren a las cervezas características distintivas ha promovido la inclusión de ingredientes funcionales en el proceso de elaboración. Por otro lado, la búsqueda de productos más naturales, saludables y respetuosos con el medio ambiente, ha impulsado la demanda de productos ecológicos. En este trabajo de investigación se ha desarrollado una nueva cerveza artesana sin alcohol, enriquecida con brotes de brócoli ecológicos (1 % p/v) adicionados en la etapa final de fermentación, con el fin de aportar nuevos sabores e incrementar la presencia de compuestos bioactivos con efectos beneficios para la salud. Una vez elaboradas las cervezas se realizó una destilación a vacío para obtener las cervezas sin alcohol. La adición de brotes de brócoli dio lugar a cervezas con menor amargor (º IBU) con respecto a las cervezas control, y presentaron mayor intensidad sensorial para los atributos floral, herbal-vegetal y tierra-cuero. El destilado de las cervezas provocó una disminución de la acidez total de las mismas, y atenuó los sabores y aromas identificados. La adición de brotes de brócoli llevó consigo un incremento en los compuestos organosulfurados que no existen en las cervezas control, y la extracción del alcohol redujo su concentración a la mitad en las cervezas embotelladas. Por tanto, el desarrollo de estas nuevas cervezas suplementadas con brotes de brócoli ecológicos podría constituir una fuente de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud.

Palabras clave: Cerveza artesanal, brotes de brócoli, ecológico, sin alcohol, compuestos bioactivos

Production of non-alcoholic craft beer functionally enriched with organic broccoli sprouts

Abstract

The craft beer market has grown significantly in recent years in many countries around the world. Consumers demand a broader variety and more quality, as well as healthier products that can contribute to human well-being. In this sense, the use of new ingredients that give beers distinctive characteristics has promoted the inclusion of functional ingredients in the production process. On the other hand, the search for more natural, healthy and environment-friendly products has driven the demand for organic products. In this research work, a new non-alcoholic craft beer has been developed, enriched with organic broccoli sprouts (1% w/v) added in the final stage of fermentation, to provide new flavors and increase the presence of bioactive compounds with beneficial health effects. Once the beers were made, a vacuum distillation was carried out to obtain the non-alcoholic beers. The addition of broccoli sprouts resulted in beer with lower bitterness (º IBU) in comparison to control beers, and higher sensory intensity for floral, herbal-vegetable and earth-leathery attributes. The distillation of the beers caused a decrease in their total acidity, and attenuated the flavors and aromas identified. The addition of broccoli sprouts led to an increase in organosulfur compounds that do not exist in control beers, and the alcohol extraction reduced their concentration to half in the bottled beers. Therefore, the development of these new beers supplemented with organic broccoli sprouts could constitute a source of bioactive compounds with beneficial effects on health.

Keywords: Craft beer, broccoli sprouts, organic, alcohol-free, bioactive compounds

Introducción

La cerveza es una bebida alcohólica de baja graduación alcohólica, resultante de la fermentación del mosto que se procede a partir de malta de cebada (Echeverria & Gutiérrez, 2010). La enorme popularidad y su elevado consumo a nivel mundial convierten a la cerveza en uno de los productos más renombradas, aportando tanto a la identidad cultural de distintas naciones del mundo como contribuyendo de manera importante a la economía (Thurnell-Read, 2016). Sin embargo, a pesar de que son varios los autores que asocian beneficios al consumo de cerveza ocasional y con moderación (González-Groset al., 2000; Marín et al., 2002; Sohrabvandi et al., 2012), la naturaleza alcohólica de la bebida ha impedido hasta el momento adjudicarle propiedades saludables o categorizarla como bebida/alimento funcional, tal y como establece el punto 3 del artículo 4 del Reglamento (CE) 1924/2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

Además, la producción y el consumo de cerveza artesana, que intenta recuperar la tradición en la elaboración de esta bebida fermentada, presenta una tendencia al alza. La cerveza de elaboración industrial, en cambio, trata de maximizar el rendimiento y buscar una mayor producción, pudiendo comprometer con ello la calidad del producto final (Martínez Muñoz, 2015). De este modo, se ha identificado una mayor cantidad de compuestos bioactivos en las cervezas artesanales que en las de tipo industrial (Martínez Muñoz, 2015), atribuido a las materias primas empleadas y a las diferencias en las etapas de procesado.

En este sentido, una técnica novedosa para mejorar la composición de las cervezas artesanas es el enriquecimiento funcional de las mismas durante su elaboración, mediante la adición ingredientes ricos en compuestos bioactivos. Investigaciones previas han mostrado que la adición de vegetales, como brócoli o alcachofa, en alguna etapa del proceso de elaboración, incrementaron el contenido en compuestos funcionales de las cervezas (Andrade Macas, 2019; Vicente Norte, 2017). Abellán et al. (2021) mostraron que al adicionar floreta de brócoli al 10 % durante el proceso de fermentación incrementó la concentración de isotiocianatos bioactivos como sulforafano de las cervezas suplementadas con brócoli. Sin embargo, en ninguno de estos experimentos se elaboró una versión sin alcohol, por lo que se incluyó esta novedad en el presente experimento.

Por lo tanto, el objetivo principal de este ensayo ha sido la elaboración de una cerveza artesana sin alcohol enriquecida funcionalmente con brotes de brócoli ecológicos en un 1 % (p/v), y el posterior análisis de características sensoriales, parámetros físico-químicos y contenido de compuestos bioactivos, comparando las cervezas enriquecidas con los brotes con los controles sin éstos, al igual que comparando las versiones sin alcohol con sus equivalentes alcohólicos.

Material y Métodos

Elaboración de cerveza artesana

Se elaboraron unos 60 litros de cerveza para el estudio en base a una cerveza tipo Pale Ale de referencia procedente de la microcervecería del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Escuela Técnica Superior de Orihuela (EPSO). Para la elaboración del mosto, se empleó la siguiente mezcla de maltas:

15 kg de ‘Pale Ale malt’, 500 g de ‘Caramel/Crystal malt’, y 300 g de ‘Chocolate malt’, así como la siguiente mezcla de lúpulos: 50 g de lúpulo ‘Topaz’, 50 g de lúpulo ‘Chinook’, y 100 g de lúpulo ‘Centennial’.

Tras la elaboración del mosto, se enfrió y trasvasó el mismo a siete tanques de fermentación, en los cuales se inoculó la levadura ('SafAle US-05') en una cantidad de 0,8 g/L. Los brotes de brócoli ecológicos, procedentes del Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del CEBAS-CSIC, fueron añadidos en una cantidad de 100 g/ 10L de cerveza (1 %), durante siete días, en la fase final de fermentación de las cervezas. Tras la semana de maceración (a temperatura ambiente) los brotes fueron eliminados. Esta concentración y tiempo de maceración fueron escogidos en base a investigaciones previas realizadas por el grupo de investigación de Post-cosecha del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la EPSO.

Eliminación del alcohol

En cuanto a la eliminación de alcohol de una parte de todas las muestras de cerveza elaboradas (2 L de cada tanque de fermentación, tanto los controles como los fermentadores enriquecidos con los brotes), se llevaron a cabo los siguientes procesos:

1) Desgasificado de las muestras en baño de ultrasonido.

2) Agitación de las muestras con agitador magnético durante 20-30 minutos.

3) Destilado del alcohol a vacío con rotavapor. Las muestras fueron introducidas en el matraz de destilación del rotavapor en cantidades de 0,5 L por lote. A una temperatura en torno a los 30 ˚C al baño maría y en constante rotación, se destiló cada lote a una presión de 0,05 bar (presión absoluta) durante un periodo comprendido entre 25 y 45 min.

4) Desinfección y embotellado. Una vez destiladas todas las muestras, se procedió a desinfectar todo el material inorgánico necesario para continuar con el proceso: botellas de vidrio, chapas, cubetas de plástico y dosificadores para pesar, embudos de vidrio. La desinfección se realizó mediante exposición a radiación ultravioleta durante una hora en la campana de extracción. Este paso se consideró necesario debido a la predisposición de la cerveza sin alcohol a ser más perecedera o sufrir alguna contaminación, se desinfectaron los materiales (botellas de vidrio, chapas, cubetas y dosificadores) mediante radiación ultravioleta. Además, se adicionó nuevamente azúcar y levadura previamente al proceso de embotellado de las cervezas sin alcohol, que se llevó a cabo bajo campana extractora. Este paso fue necesario para generar la carbonatación de las cervezas en la botella, aunque ello implica también la reaparición de una cantidad residual de alcohol debido a una segunda fermentación en botella. En todo caso, esta cantidad de alcohol se considera despreciable (< 1%). La concentración de levadura y azúcar adicionada fue la misma que en la fermentación inicial de las cervezas elaboradas (0,8 g de levadura y 6 g de azúcar/L de cerveza).

Parámetros físico-químicos

Se midieron los parámetros de densidad y grado alcohólico de todas las cervezas elaboradas, al igual que la acidez total, expresada como gramos de ácido láctico/ 100 mL de cerveza; el pH; el amargor, expresado en º IBU; y el color de las cervezas elaboradas, expresado en º EBC según la European Brewery Convention. Estas mediciones se llevaron a cabo según el protocolo seguido en Dobón-Suárez et al. (2020).

Contenido de compuestos bioactivos

Se midió el contenido fenólico (mediante el método Folin-Ciocalteu) y la actividad antioxidante total (con el método ABTS+) de las cervezas elaboradas siguiendo el protocolo descrito por Dobón-Suárez et al. (2020).

Por otro lado, la extracción y análisis de compuestos organosulfurados (glucosinolatos e isotiocianatos), fue llevada a cabo mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD) de acuerdo a Abellán et al. (2021). Esta determinación se realizó en el CEBAS-CSIC por el Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales del departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Análisis sensorial

Con el fin de evaluar las características organolépticas de la cerveza sin alcohol enriquecida funcionalmente con brotes de brócoli ecológico, y contrastar los resultados obtenidos tanto con las mismas muestras que conservaron su contenido alcohólico, como con las cervezas control, se realizó una cata sensorial. En esta evaluación sensorial descriptiva participaron 10 panelistas entrenados ara la evaluación de cerveza, 50 % mujeres y 50 % hombres, con edades comprendidas entre 21 y 45 años. Todos están asociados al Departamento de Tecnología Alimentaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en el campus de la EPSO, siendo miembros de los grupos de investigación de Calidad y Seguridad Alimentaria y Post-recolección. El panel cuenta con una experiencia conjunta de más de 500 h de catas sensoriales de distintas bebidas, verduras, frutas, carne y otros alimentos. Se midió tanto el color (fase visual), como distintos atributos de la fase olfativa y gustativa de las cervezas. Para la determinación de color, el panel comparó las distintas muestras con una tabla de referencia basada en método analítico de la European Brewery Convention, que atribuye una puntuación numérica (º EBC) a cada tonalidad de color (Casares & Minero, 2018). Para la evaluación de los aromas y sabores percibidos en esta fase, los panelistas emplearon se una escala numérica, cuantificando la intensidad de los aromas y sabores identificados, al igual que otros atributos. El 0 representa una intensidad muy baja, y el 10 muy alta, con incrementos de 1 unidad. Concretamente, los aromas-sabores puntuados en estas fases fueron: Malta-galleta, grano de cereal, tostado, caramelo, frutos secos (nuez), almendra amarga, lúpulo, floral, herbal-vegetal, vegetal cocinado (DMS), levadura, tierra-cuero, alcohólico, dulce, ácido, amargo. Además, se evaluaron los atributos: calor en boca, cuerpo, postgusto, y carbonatación-picante.

Resultados y Discusión

La densidad inicial del mosto producido fue de 1046 g/L. Tras el proceso de fermentación, en el que las levaduras van consumiendo los azúcares solubles del mosto y produciendo etanol (lo cual provoca una disminución de la densidad), el porcentaje de alcohol medio de las muestras de cerveza fue de 4,56 %. No hubo diferencias significativas entre las muestras control y las muestras elaboradas con brotes de brócoli. Este valor se corresponde con una cerveza de sabor suave (4.6-5.1) en cuanto a su contenido alcohólico, según Tintó García-Moreno et al., 2004 y de acuerdo con el Real Decreto 678/2016, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y las bebidas de malta. El contenido alcohólico de las cervezas destiladas fue de < 1 %.

La adición de brotes de brócoli disminuyó el amargor de las cervezas obtenidas con respecto a las cervezas control. Además, la eliminación de alcohol de las cervezas también redujo considerablemente el amargor en la cerveza resultante. Estos resultados fueron coincidentes con la evaluación realizada por parte del panel entrenado para el atributo amargo (Figura 1). Los resultados de análisis sensorial descriptivo mostraron que las cervezas con brotes presentaron intensidades superiores para los atributos tierra-cuero, floral, y herbal-vegetal. Por otro lado, atributos como malta-galleta, tostado y caramelo fueron evaluadas con intensidades menores en las cervezas con brotes que en las cervezas control. Asimismo, las cervezas sin alcohol presentaron características organolépticas similares a sus equivalentes con contenido alcohólico, pero con rasgos bastante menos marcados. Estas pérdidas de sabor y aroma son habituales en cerveza sin alcohol o con muy bajo contenido alcohólico, y se deben entre otros factores a la pérdida de sustancias volátiles (como ésteres y terpenoides) que aportan aromas durante el proceso de destilado (Casares y Minero, 2018; Labrado et al., 2020).

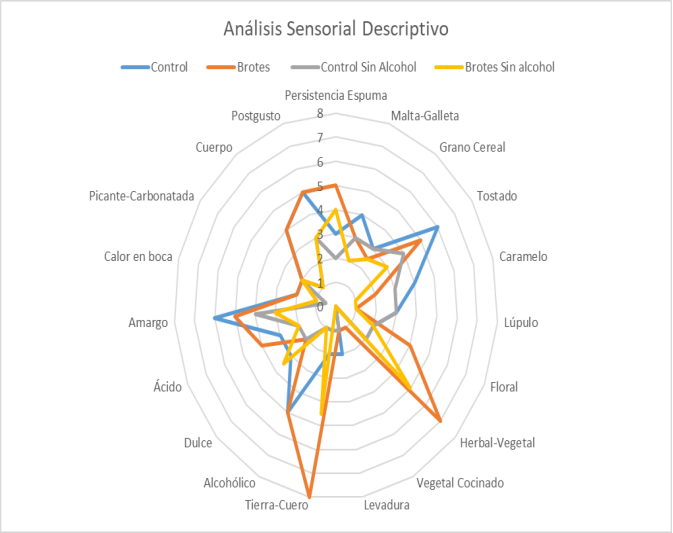


Figura 1. Aromas y sabores de las diferentes cervezas elaboradas, y su intensidad identificada.

Las cervezas con contenido alcohólico presentaron una acidez superior (0,3 g ácido láctico/100 mL) a las cervezas destiladas (0,2-0,25 g ácido láctico/100 mL) (Figura 2A), lo cual puede deberse al proceso de desgasificación más prolongado e intenso al que fueron sometidas las muestras sin alcohol, conllevando una menor cantidad de anhídrido carbónico disuelto. Por el contrario, el amargor de las cervezas elaboradas, que depende principalmente de los iso-α-ácidos del lúpulo (Casares y Minero, 2018; Mencia y Pérez, 2016; Rodríguez, 2003), fue mayor en la cerveza control con alcohol que en las demás cervezas elaboradas (cerveza con alcohol enriquecida con brotes y cervezas sin alcohol) (Figura 2B). Ello indica que tanto el proceso de destilado como la propia adición de los brotes de brócoli disminuye el contenido de iso-α-ácidos en las cervezas.

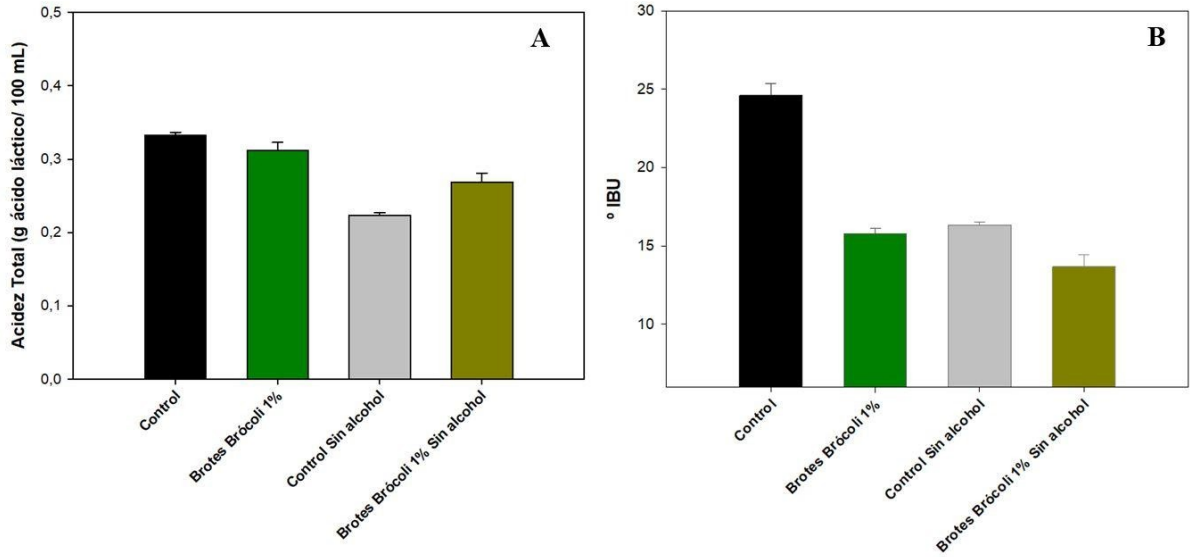


Figura 2. A) Acidez total (g ácido láctico/100 mL); B) Amargor o ºIBU de las cervezas elaboradas.

El color es un importante parámetro de calidad en el mercado de la cerveza y su producción, determinado sobre todo por la mezcla de maltas empleada (Fengxia et al., 2004; Vicente Norte, 2017). No se encontraron diferencias significativas de color entre las distintas cervezas elaboradas, encontrándose todas ellas en valores de 30-32 º EBC (Figura 3).

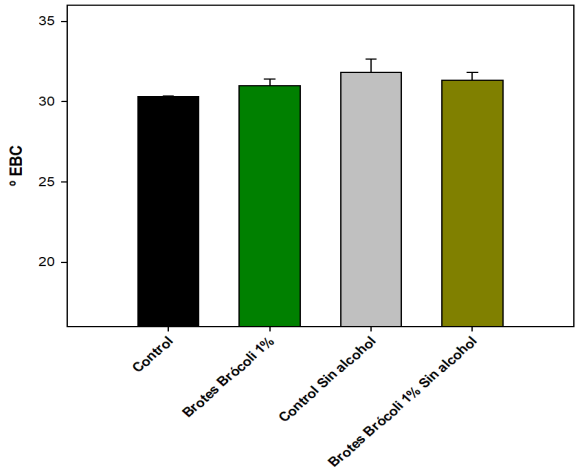


Figura 3. º EBC de las cervezas elaboradas.

En cuanto a la concentración de fenoles, no se observaron diferencias significativas entre las cervezas elaboradas con o sin brotes de brócoli, ni entre las cervezas con o sin alcohol. La concentración de fenoles totales se situó en torno a los 35-38 mg ácido gálico/100 mL en todas las cervezas elaboradas (Figura 4). Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante, con valores de 46-48 meq Trollox/100 mL en la fase hidrosoluble (AAT-H) (Figura 5A), y de 11-12 meq Trollox/100 mL en la fase liposoluble (AAT-L) (Figura 5B). Estos resultados nos hacen concluir que las técnicas utilizadas para la determinación de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante no tuvieron la precisión necesaria para mostrar un incremento de dichos parámetros causados por la adición de los brotes de brócoli. Sin embargo, un aspecto positivo a destacar es que en el proceso de eliminación de alcohol no parecen perderse compuestos bioactivos. La eliminación de alcohol no disminuye el contenido en compuestos fenólicos de la cerveza ni su capacidad antioxidante asociada. Por tanto, las cervezas sin alcohol elaboradas constituyen en este aspecto una alternativa más sana por no llevar alcohol, pero con las mismas propiedades antioxidantes.

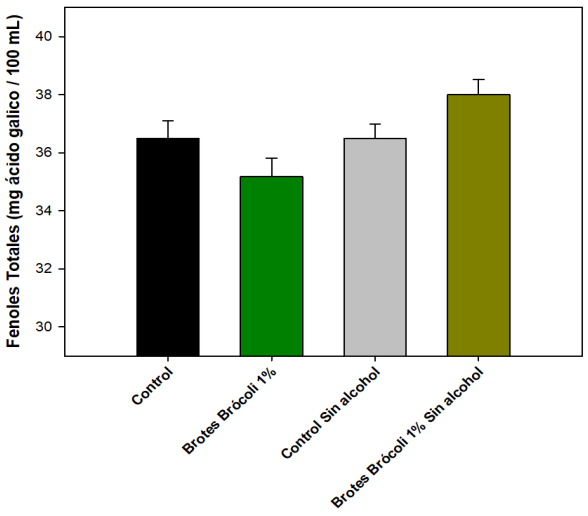


Figura 4. Contenido de fenoles totales en las cervezas elaboradas.

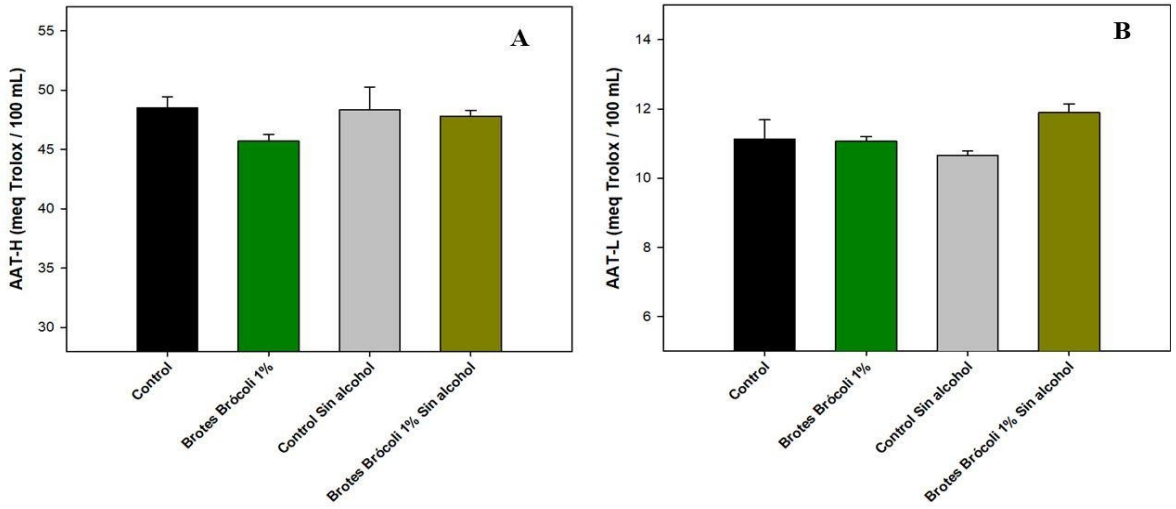


Figura 5. Actividad antioxidante total en la fase hidrosoluble (A) y liposoluble (B) de las cervezas elaboradas.

Además, la determinación de los fitoquímicos organosulfurados característicos de los brotes, glucosinolatos e isotiocianatos (que tienen numerosos beneficios potenciales asociados a su ingesta), que fueron llevados a cabo en el CEBAS-CSIC (datos no mostrados), mostraron que la concentración de glucosinolatos en las cervezas con alcohol enriquecidas con brotes de brócoli fue el doble que en las cervezas sin alcohol, y no se detectaron glucosinolatos en las cervezas control. Estudios recientes que valoraron los compuestos organosulfurados en cervezas enriquecidas con brócoli (Abellán et al., 2021), midiendo el glucosinolato glucorafanina y su derivado funcional, el isotiocianato sulforafano, encontraron cantidades relevantes en las cervezas enriquecidas en comparación con los controles, lo que demuestra la ventaja funcional de las cervezas enriquecidas con los brotes frente a las convencionales.

El pH es importante desde el punto de vista de calidad y seguridad de la cerveza. La legislación en España exige que el valor final de pH de cervezas sea inferior a 5,5 (Real Decreto 678/2016). No se observaron diferencias significativas en cuanto al pH de las distintas cervezas elaboradas en esta investigación (con alcohol, sin alcohol, con brotes y sin brotes). Todas presentaron valores similares, en torno a 4 (Figura 6), con lo que cumplen con la legislación.

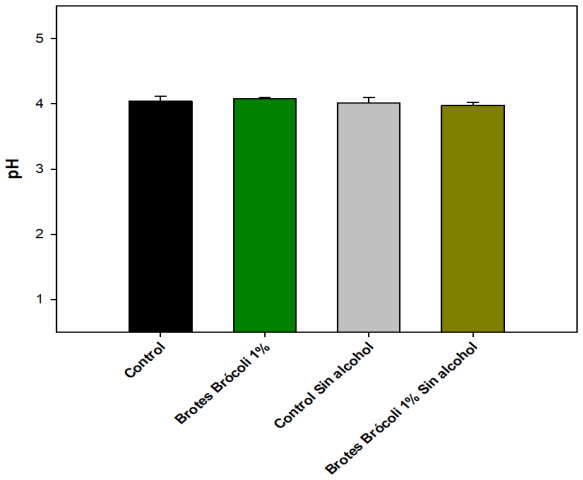


Figura 6. Valores de pH de las cervezas elaboradas.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este ensayo indican que las cervezas en las que se produjo el enriquecimiento con los brotes de brócoli mostraron menor amargor (º IBU) que las cervezas control. El amargor se vio afectado de modo similar debido a la eliminación de alcohol de las cervezas. Además, el proceso de destilado atenuó la intensidad de los atributos sensoriales característicos de la cerveza artesana, ya fueran éstas con o sin brotes de brócoli añadido posterior a la fermentación. La actividad antioxidante total y el contenido fenólico no reflejó diferencias entre las distintas muestras, pero se demostró una mejora funcional de aquellas cervezas enriquecidas con los brotes al detectarse en ellas compuestos organosulfurados específicos provenientes del brócoli (glucosinolatos e isotiocianatos). El contenido de estos compuestos bioactivos característicos se vio reducido al 50 % en las versionas desalcoholizadas en comparación con sus correspondientes versiones con contenido alcohólico.

Bibliografía

Abellán, Á., Domínguez-Perles, R., Giménez, M. J., Zapata, P. J., Valero, D., & García-Viguera, C. (2021). The development of a broccoli supplemented beer allows obtaining a valuable dietary source of sulforaphane. *Food Bioscience*, *39*, 100814.

Andrade Macas, J. S. (2019). *Elaboración de cerveza artesana con brócoli*. [Trabajo Fin de Grado, Universidad Miguel Hernández de Elche].

Casares, J. M. C., & Minero, F. J. G. (2018). *Estudio Botánico de la Cerveza*. [Informe técnico del Proyecto de Fin de Grado, Universidad de Sevilla].

Dobón-Suárez, A. (2020). Desarrollo de nuevas cervezas artesanas enriquecidas con naranja. [Trabajo Fin de Grado, Universidad Miguel Hernández de Elche].

Echeverria, J., & Gutiérrez, R. (2010). Determinación de las características del mosto elaborado con malta caramelo para elaborar una cerveza artesanal. En *XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, México*.

Fengxia, S., Yuwen, C., Zhanming, Z., & Yifeng, Y. (2004). Determination of beer color using image analysis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *62*(4), 163-167.

González-Gros, M., Lebrón, M. R., & Marcos, A. (2000). Revisión bibliográfica sobre los efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud. *Centro de Información Cerveza y Salud*.

Labrado, D., Ferrero, S., Caballero, I., Alvarez, C. M., Villafañe, F., & Blanco, C. A. (2020). Identification by NMR of key compounds present in beer distillates and residual phases after dealcoholization by vacuum distillation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(10), 3971-3978.

Marín, A. V., Moreno, P. P., Álvarez, J. M., Soriano, I. O., Astasio, P., & Ortega, P. (2002). Cerveza y enfermedad cardiovascular. Revisión bibliográfica sistemática (metaanálisis). *Nutrición Hospitalaria*, *17*(3), 122-127.

Martínez Muñoz, A. (2015). Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial. [Trabajo Fin de Grado, Universidad de Lleida]. http://hdl.handle.net/10459.1/48689

Mencia, G. A., & Pérez, R. D. (2016). *Desarrollo de cerveza artesanal ale y lager con malta de maíz (Zea mays), cebada (Hordeum vulgare), carbonatada con azúcar y miel de abeja*. [Proyecto Fin de Carrera, Escuela Agrícola Panamericana].

Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, de 17 de diciembre de 2016, núm. 304. [Consultado en: mayo de 2021] Disponible en: https://www.boe.es/boe/dias/2016/12/17/pdfs/BOE-A-2016-11952.pdf

Reglamento (CE) del Parlamento Europeo y del Consejo n.°1924/2006, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 404/9. Disponible en: http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1924/oj

Rodríguez Cárdenas, H. A. (2003). *Determinación de parámetros físico-químicos para la caracterización de cerveza tipo lager elaborada por compañía cervecera Kunstmann SA*. [Trabajo Fin de Grado, Universidad Austral de Chile].

Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., & Rezaei, K. (2012). Health-related aspects of beer: a review. *International Journal of Food Properties*, *15*(2), 350-373.

Thurnell-Read, T. (2016). Beer and Belonging: Real Ale consumption, place and identity. En Thurnell-Read, T. (Ed.), *Drinking Dilemmas: Space, Culture and Society* (pp.45-61). Londres, Inglaterra: Routledge/BSA Sociological Futures.

Tintó García-Moreno, A., Sánchez Lomares, F., Vidal Taboada, J. M. & Vijande Majem, P. (2004). *La cerveza artesanal: cómo hacer cerveza en casa*. Barcelona, España: CerveArt.

Vicente Norte, J. J. (2017). *Proceso de elaboración de cerveza enriquecida con alcachofa*. [Trabajo Fin de Grado, Universidad Miguel Hernández de Elche].

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Alteración de la microbiota intestinal en pacientes con *COVID-19*

P. Bersano-Reyes[1] y G. Nieto-Martínez[2]

Departamento de Tecnología Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad Veterinaria, Universidad Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, España. pazandrea.bersanor@um.es [1], Tel.: +34-622603345, gnieto@um.es [2]

Resumen

Las investigaciones en tiempos de pandemia del Covid-19 han ido variando las líneas de acción a fin de cubrir todas las áreas en las que el nuevo coronavirus, conocido como SARS-CoV-2, tiene algún tipo de interacción.

Dentro de las complicaciones del Covid-19 están las respiratorias, como el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) y el Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS), las cuales han mostrado variación en la microbiota pulmonar y linfopenia, por lo que se han establecido distintas técnicas y tratamientos para lograr compensar a los pacientes y evitar el riesgo mayor que es la muerte. Además se han evidenciado cambios importantes en la microbiota intestinal, la cual juega un rol clave en los mecanismos de defensa, por tanto puede ser considerada como parte del tratamiento antiviral, tanto para esta pandemia como para combatir otros virus.

Es fundamental reforzar medidas preventivas y multidisciplicarias que fortalezcan a estos microorganismos, principalmente bacterias, considerando factores demográficos, socioeconómicos, nutricioinales y de estilo de vida, para lograr mantener una microbiota intestinal activa y reactiva.

Palabras clave: Microbiota intestinal, Covid-19, SARS, Intestino.

Alteration of the gut microbiota in patients with COVID-19

Abstract

Investigations in times of the Covid-19 pandemic have been varying the lines of action in order to cover all the areas in which the new coronavirus, known as SARS-CoV-2, has some type of interaction.

Among the complications of Covid-19 are respiratory complications, such as Acute Respiratory Distress Syndrome (SDRA) and Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), which have shown variation in the lung microbiota and lymphopenia, for which they have been established different techniques and treatments to achieve compensation to patients and avoid the greater risk that is death. In addition, important changes have been evidenced in the intestinal microbiota, which plays a key role in defense mechanisms, therefore it can be considered as part of antiviral treatment, both for this pandemic and to combat other viruses.

It is essential to reinforce preventive and multidisciplinary measures that strengthen these microorganisms, mainly bacteria, considering demographic, socioeconomic, nutritional and lifestyle factors, in order to maintain an active and reactive microbiota.

Keywords: Gut microbiota, Covid-19, SARS, Intestine.

Introducción y/o Justificación

La pandemia actual del COVID-19 está mostrando lo relevante de la investigación en distintas áreas para entregar insumos con base científica que permitan apoyar el control los contagios. Algunas de las áreas que se están investigando son la virulencia, comorbilidades, secuelas, mortalidad, diferencia de genotipos, área geográfica y grupos etarios más afectados.

El tracto gastrointestinal constituye una interfase muy sensible para el contacto y comunicación entre el individuo y el medio externo. Para la perfecta homeostasis, el sistema tiene que distinguir claramente entre patógenos o patógenos potenciales de un lado, y microbios comensales en simbiosis con el anfitrión de otro. En el primer caso, el organismo debe dotarse de elementos de defensa adecuados, mientras que, en el segundo caso, el anfitrión tiene que saber tolerar para obtener el beneficio de la simbiosis. Las interacciones entre los microorganismos, el epitelio y los tejidos linfoides intestinales son múltiples, diversas en sus características y continuas, de modo que remodelan constantemente los mecanismos locales y sistémicos de la inmunidad adaptándolos al ambiente microbiano (Guarner, 2007).

La célula epitelial juega un papel muy importante en la logística del sistema inmune. Su posición en primera línea y en contacto con la luz intestinal es crucial para el reconocimiento inicial de moléculas foráneas y para la generación de señales que se transmiten a las células inmunocompetentes del tejido subyacente. La activación de los mecanismos de defensa depende en primer lugar del reconocimiento rápido de riesgo a través de receptores innatos o pre-formados que detectan componentes estructurales comunes a bacterias o virus, pero ausentes en la célula eucariota. Esto se realiza en el medio extracelular mediante los Toll-like-receptors (TLR) de la membrana, y en el medio intracelular mediante las proteínas tipo NOD del citosol. La activación de estos sensores por invasión bacteriana genera inmediatamente señales que convergen en la migración de factores de transcripción (NF-kappaB y otros) al núcleo celular, donde activan la expresión de genes responsables de la síntesis de proteínas proinflamatorias, básicamente citoquinas y enzimas inducibles con capacidad para generar mediadores inflamatorios. De este modo, las células epiteliales emiten señales con capacidad de atraer y activar leucocitos, aumentar el flujo sanguíneo, incrementar la permeabilidad capilar, etc. Los enterocitos pueden actuar como células presentadoras de antígenos, sugiriendo que su rol no se limita a la defensa innata sino que también participan en el escalón inicial de las respuestas de tipo adquirido (expansión de clones linfocitarios específicos y generación de anticuerpos)(Guarner, 2007).

Existe a nivel intestinal una variada e importante “Microbiota”, compuesta por una población de más de 100 billones de bacterias, con alrededor de 1.000 especies diferentes, que es la que modula nuestro sistema inmunológico. Las bacterias nativas (colonizan el tracto gastrointestinal) la adquirimos al nacer (estableciéndose incluso desde la gestación), mientras que las bacterias de tránsito (transitan temporalmente el tubo digestivo) se ingieren a través de nuestra alimentación (CSIC,2021).

Para hacer frente a la infección por Sars-Cov-2 están involucrados los sistemas inmunológico innato y adaptativo. Se tiene claro el período de incubación promedio del COVID-19 que sería de 3.0 días (rango: 0-24.0), la variación del virus en los distintos grupos etarios y en cuanto a la sintomatología se conoce que la fiebre, fatiga, tos seca, además del SDRA, linfopenia, son las complicaciones comunes y el SARS es la complicación grave de neumonía en pacientes con COVID-19. Además hay evidencia que muestra que la microbiota pulmonar de los pacientes con SDRA es diferente de la de los pacientes sin SDRA, lo que ha guiado a los investigadores a centrar sus estudios iniciales en el aparato respiratorio (de León Delgado *et al.*, 2020).

Además, cuando hay contagio por Covid-19 genera alteraciones en la microbiota intestinal, la que se anticiparía al cambio en los niveles sanguíneos de otros marcadores. Además, la expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) está disminuida en las células T y B en pacientes con SRAS, por lo que la regulación de la microbiota intestinal dependiente de ACE2 explicaría los

cambios en los niveles de péptidos antimicrobianos y la aparición de diarreas. Esto demuestra la importancia de ser considerada al momento del diagnóstico y tratamiento (Choi *et al*., 2020)

Material y Métodos

Revisión bibliográfica, WOS, Pubmed, Google scholar, alteración Microbiota y Covid-19.

Resultados y Discusión

Entre los individuos sanos no infectados, las características microbianas intestinales son altamente predictivas de los biomarcadores proteómicos sanguíneos de la enfermedad grave por COVID-19. La alteración de las características correspondientes del microbioma intestinal puede predisponer potencialmente a los individuos sanos a un estado inflamatorio anormal, lo que puede explicar además la susceptibilidad y la gravedad de COVID-19. El análisis de metabolómica fecal revela que la vía relacionada con los aminoácidos puede proporcionar el vínculo clave entre la microbiota intestinal central identificada, la inflamación y la susceptibilidad a COVID-19. Además, es probable que las modificaciones en los factores ambientales y del huésped influyan en las composiciones de la microbiota intestinal central mencionadas anteriormente (de León Delgado *et al.*, 2020).

Una posible ruta de la infección sería desde la tráquea hasta el esófago, ya que el análisis del transcriptoma unicelular ha mostrado que la ECA2 se expresa en gran medida en las células pulmonares células alveolares tipo AT2, las células epiteliales estratificadas en la parte superior del esófago y los enterocitos en el íleon y el colon. Además, los hisopos faríngeos, las biopsias esofágicas, las muestras de heces, así como las muestras de la mucosa gástrica, rectal y duodenal han dado positivo para SARS-CoV-2. Además, la expresión de ACE2 en células endoteliales y macrófagos y la detección de virus en plasma y linfocitos sanguíneos indican la posibilidad de infección del torrente sanguíneo por SARS-CoV-2. Sin embargo, no se ha confirmado la transmisión fecal-oral del SARS-CoV-2 (Choi *et al*., 2020).

Los virus respiratorios pueden cambiar la composición del microbiota intestinal. Se ha demostrado que la abundancia de Proteobacteria y Bacteroidetes aumenta, mientras que la abundancia de Firmicutes disminuye durante las infecciones por influenza y virus respiratorio sincicial. La influencia de estos virus en el microbiota intestinal puede estar mediada por señales sistémicas, incluidos los tipos I y II de IFN (Interferones Humanos), cambios fisiológicos y una mayor susceptibilidad a la colitis. Estos datos sugieren que el microbiota intestinal mejora la inmunidad antiviral y puede desempeñar un papel en la infección por SARS-CoV-2. Están en curso ensayos clínicos sobre el trasplante de microbiota intestinal en pacientes con COVID-19 , no obstante, se necesitan estudios adicionales para dilucidar este papel (Choi *et al*., 2020).

La complicación más común de COVID-19 es el SDRA, que afecta al 3.4% de los pacientes infectados y al 15.6-17.0% de los pacientes graves. La linfopenia es común en pacientes graves y críticos y rara en pacientes con síntomas leves. Los síntomas gastrointestinales son comunes en los pacientes con COVID-19, y un metanálisis mostró que estos síntomas ocurrieron en el 17,6% de los pacientes infectados y fueron más comunes en los pacientes graves (Choi *et al*., 2020).

En otro estudio los pacientes con COVID-19 tenían alteraciones significativas en los microbiomas fecales en comparación con los controles, caracterizados por el enriquecimiento de patógenos oportunistas y el agotamiento de los comensales beneficiosos, en el momento y durante la hospitalización. Los simbiontes empobrecidos y la disbiosis intestinal persistieron incluso después de la eliminación del SARS-CoV-2 (determinado a partir de frotis de garganta) y la resolución de los síntomas respiratorios. La abundancia inicial de *Coprobacillus* , *Clostridium ramosum* y *Clostridium*

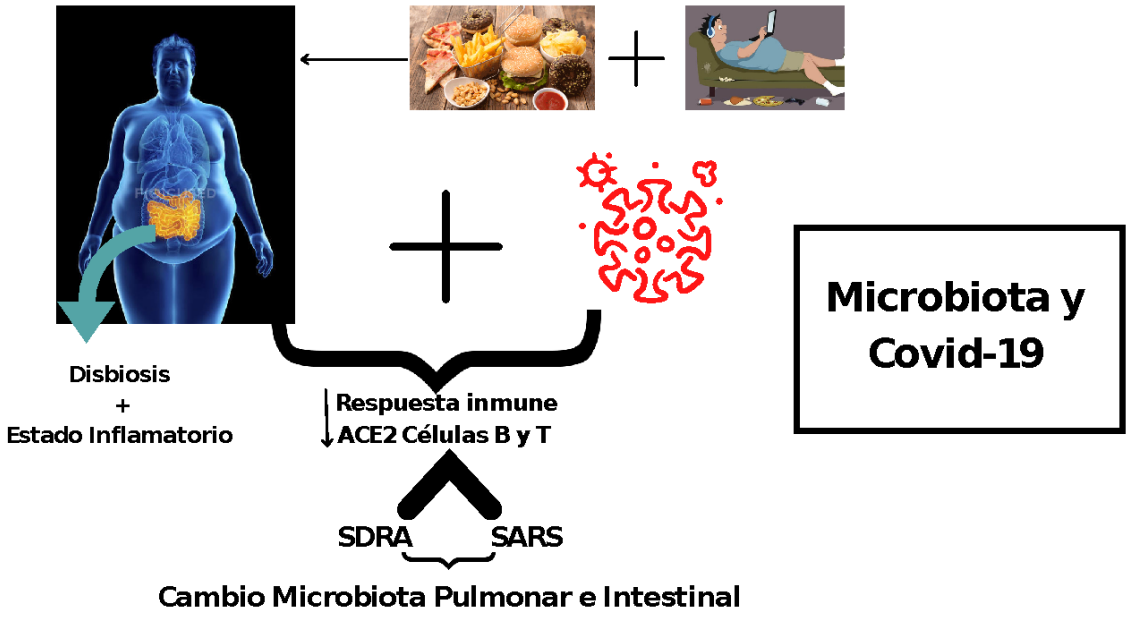
hathewayi se correlacionó con la gravedad de COVID-19; hubo una correlación inversa entre la abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* (una bacteria antiinflamatoria) y la gravedad de la enfermedad. Durante el transcurso de la hospitalización, *Bacteroides dorei* , *Bacteroides thetaiotaomicron* , *Bacteroides massiliensis* y *Bacteroides ovatus,* que regulan negativamente la expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en el intestino, se correlacionaron inversamente con la carga de SARS-CoV-2 en muestras fecales de pacientes (He *et al*., 2021).

El uso de antibióticos empíricos (que era común en el brote inicial de SARS-CoV-2 cuando las bacterias secundarias la infección era una preocupación) condujo a una mayor pérdida de beneficiosos simbiontes y exacerbación de la disbiosis intestinal en pacientes con COVID-19. Existen datos que respaldan la evitación de uso de antibióticos en el tratamiento de la neumonitis viral, ya que éstos pueden eliminar las bacterias beneficiosas y debilitar la barrera intestinal. La perturbación puede alterar la inmunidad a las vacunas en los seres humanos. Por tanto, es necesario mejorar la eficacia de futuras intervenciones inmunitarias como vacunas, mediante la modulación del microbioma intestinal, incluir medidas para mejorar la producción de butirato intestinal a través de la promoción de interacciones microbianas por cambios en la dieta y reducción de estados proinflamatorios (He *et al*., 2021).

La evidencia acumulada sugiere que la "tormenta de citocinas", una producción excesiva de citocinas inflamatorias, puede ser un mecanismo importante que conduce a la gravedad y muerte de los pacientes con COVID-19. Por lo tanto, la terapia con anticitocinas para la supresión del estado hiperinflamatorio de los pacientes es una estrategia recomendada para tratar pacientes con COVID-19 grave. Entre los 20 predictores proteómicos de COVID-19 grave, varias de las proteínas más reguladas al alza son proteínas de fase aguda activadas, que incluyen el amiloide sérico A-1 (SAA1), SAA2, SAA4, alfa-1-anticimotripsina (SERPINA3), complemento 6 (C6) y factor de complemento B (CFB). Estas proteínas pueden activarse junto con citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF-α tras la invasión del SARS-CoV-2. Por lo tanto, este conjunto de biomarcadores proteómicos puede servir como un biomarcador importante o una diana terapéutica para tratar la infección por SARS-CoV-2 (Zou *et al*., 2020).

Se ha establecido que la dieta basada en alimentos vegetales promueve los microbios que provocan la respuesta antiinflamatoria y, por lo tanto, se sabe que mantiene una microbiota más diversa y estable. En otras palabras, una dieta vegetariana parece ser más beneficiosa para la salud humana debido a su capacidad para mantener un estado de simbiosis, es decir, una microflora equilibrada dentro del huésped. En contraste con esto, ciertos alimentos como el gluten en el trigo, la carne roja y el alcohol pueden promover el crecimiento de microorganismos disbióticos que desencadenan una mayor respuesta proinflamatoria, culminando así en una inflamación crónica. Se ha informado que esta inflamación crónica causa fugas intestinales debido a la degradación de las uniones estrechas por varias proteasas, permitiendo así la diseminación de células, bacterias patógenas y virus en la circulación sanguínea y transformando el estado existente de inflamación intestinal en inflamación sistémica crónica. Esta inflamación crónica puede pasar desapercibida durante años, actuando como un factor de riesgo predisponente que puede, en cualquier momento, agravarse en dolencias y otras manifestaciones graves, por lo que puede considerarse como una comorbilidad (Gou *et al*., 2020). Por tanto, al existir una disbiosis se está más susceptible a riesgo grave en caso de contagio por Covid-19.

Estudios adicionales deben incluir prospectivamente a sujetos asintomáticos e infectados con SARS-CoV-2, seguido al inicio y durante la enfermedad y a largo plazo después del descubrimiento para delinear el papel de los cambios del microbioma en el SARS-CoV-2 infección y recuperación posinfección. (CSIC,2021)



Conclusiones

La adecuada actividad del tracto gastrointestinal juega un papel clave para la salud y regulación del sistema inmune a través de la microbiota intestinal, por tanto es fundamental que estos microorganismos, especialmente las bacterias, puedan estar activas y reactivas al medio externo e interno, siendo necesario establecer estilos de vida saludables desde la gestación.

Dentro de las funciones de la microbiota intestinal está la nutrición, metabolismo, junto a la regulación de defensa y protección, además de tener un efecto "barrera" (por la segregación de bacteriocinas) al momento de la invasión de agentes infecciosos o el sobrecrecimiento de especies residentes con potencial patógeno u oportunistas, que permite modular la homestoasis de los procesos celulares, virales y bacterianos.

Es fundamental continuar con estudios específicos en esta área, ya que al existir contagio con Covid-19 existen biomarcadores que muestran cambios importantes en la microbiota intestinal, además de ACE2 disminuida en pacientes con SRAS, junto a alteraciones digestivas, como es el aumento de las deposiciones líquidas (diarreas) y sus efectos colaterales (deshidratación entre otros).

Por otra parte, mencionar que la microbiota intestinal sería uno de los recursos protectores en la población infantil, por ello su menor incidencia en los contagios, ya que estos microorganismos están más activos y funcionales que en la població adulta. Por ello considerarla al inicio en el diagnósito y tratamiento es importante.

Agradecimientos

Equipos sanitarios que están en primera línea trabajando en esta pandemia.

Universidad de Murcia, siempre aportando con la comunidad científica.

Bibliografía

Choi M, Aiello EA, Ennis IL, Villa-Abrille MC. El SRAA y el SARS-CoV-2: el acertijo a resolver. Hipertensión y Riesgo Vascular. octubre de 2020;37(4):169-75.

CSIC. 'El primer contacto con microbios se da en el parto y es muy importante para el bebé' [Internet]. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2019 [citado 4 de octubre de 2021]. Disponible en: https://www.csic.es/

de León Delgado J, Pareja Cruz A, Aguilar Ramirez P, Enriquez Valencia Y, Quiroz Carrillo C, Valencia Ayala E, et al. SARS-CoV-2 y sistema inmune: una batalla de titanes. Horizonte Médico (Lima) [Internet]. abril de 2020 [citado 4 de octubre de 2021];20(2). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1727-558X2020000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Gou W, Fu Y, Yue L, Chen G, Cai X, Shuai M, et al. Gut microbiota may underlie the predisposition of healthy individuals to COVID-19. medRxiv. 25 de abril de 2020;2020.04.22.20076091.

Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. Nutrición Hospitalaria. mayo de 2007; 22:14-9.

Gut microbiota and Covid-19- possible link and implications | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [citado 27 de febrero de 2021]. Disponible en: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0168170220304603?token=76F454A551F59B21A1D9BFD9E4D5939986938FD83B4FA7AF1C05B575A1EAF0E851E0AF8AE685D20F7D9BFC85B3EC2F3B

He Y, Wang J, Li F, Shi Y. Main Clinical Features of COVID-19 and Potential Prognostic and Therapeutic Value of the Microbiota in SARS-CoV-2 Infections. Front Microbiol [Internet]. 2020 [citado 6 de mayo de 2021];11. Disponible en: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01302/full?report=reader

Zuo T, Zhang F, Lui GCY, Yeoh YK, Li AYL, Zhan H, et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. Gastroenterology. 1 de septiembre de 2020;159(3):944-955.e8.

II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUISA)
16 al 17 de Septiembre de 2021

Caracterización de compuestos bioactivos de las semillas de dos cultivares de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. en condiciones homogéneas de cultivo

L. Andreu-Coll [1], J. Kolniak-Ostek [2], A. Kita [3], J. Miedzianka [3], P. Legua [1] y F. Hernández [1]

[1] Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH). Ctra. Beniel, km 3.2, 03312, Orihuela, Alicante. Email: lucia.andreu1@gmail.com
[2] Department of Fruit, Vegetable and Plant Nutraceutical Technology, Worclaw University of Environmental and Life Sciences, Chelmonskiego 37 Street, 51-630 Worclaw, Poland
[3] Department of Food Storage and Technology, Worclaw University of Environmental and Life Sciences, Chelmonskiego 37 Street, 51-630 Wrclaw, Poland

Resumen

Las semillas de la chumbera (*Opuntia ficus-indica* (L). Mill) suelen desecharse tras de la extracción de la pulpa de los frutos durante la elaboración de productos procesados. El estudio de la composición de estas semillas podría ayudar a encontrar posibles usos en las industrias cosmética y farmacéutica, alimentación animal y consumo humano como una fuente novedosa de aceite y harina. En este trabajo se estudiaron las semillas de los frutos de dos cultivares de chumbera ('NE' y 'NO'), obtenidos en la finca experimental de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO). Se determinaron los siguientes parámetros: compuestos fenólicos, actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP), porcentaje graso y perfil de ácidos grasos. Los compuestos fenólicos predominantes fueron los ácidos fenólicos y flavonoles, siendo el cultivar 'NE' el que mostró una concentración más elevada de estos compuestos, así como una actividad antioxidante más elevada mediante los tres métodos utilizados. El ácido linoleico fue el ácido graso mayoritario en ambos cultivares y, aunque en el cultivar 'NO' se encontró porcentaje graso más elevado, el cultivar 'NE' mostró un mayor porcentaje de este ácido y ácidos grasos poliinsaturados. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las semillas de ambos cultivares son una fuente excelente de nutrientes y sustancias promotoras para la salud. Además, se podrían utilizar en la industria cosmética y farmacéutica como fuente de estos compuestos. Asimismo, estos usos contribuirían a reducir la cantidad de residuos generados durante el proceso de extracción de la pulpa del fruto para la elaboración de alimentos procesados.

Palabras clave: chumbera, semillas, actividad antioxidante, ácidos grasos, proteínas

Characterization of bioactive compounds of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. seeds from two Spanish cultivars under homogeneous growing conditions

Abstract

Prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L). Mill) seeds are usually discarded after extraction of the fruit during the production of processed products. The study of the composition of these seeds could help to find possible uses in the cosmetic and pharmaceutical industries, animal feed and human consumption as a new source of oil and flour. In this work, the seeds of two prickly pear cultivars ('NE' and 'NO'), obtained in the experimental field station of Miguel Hernández University, were studied. The following parameters were determined: phenolic compounds, antioxidant activity (DPPH, ABTS and FRAP), fat content, and fatty acid profile. The predominant phenolic compounds were phenolic acids and flavanols, being 'NE' cultivar the one that showed the higher concentration of these compounds, as well as a higher antioxidant activity by the three methods. Linoleic acid was the predominant fatty acid in both cultivars. 'NO' cultivar showed the higher fat content, but 'NE' cultivar presented higher percentages of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. The results obtained show that the seeds of both cultivars are an excellent source of nutrients and health promoting substances. Furthermore, they could be used in the cosmetic and pharmaceutical industry as a source of these compounds. Likewise, these uses would contribute to reducing the amount of waste generated during the extraction process of the fruit pulp for the preparation of processed foods.

Keywords: prickly pear, seeds, antioxidant activity, fatty acids, proteins

Introducción y/o Justificación

La chumbera (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) es la cactácea con la mayor importancia económica del mundo. Esta planta es principalmente conocida por sus frutos, conocidos como higos chumbos o tunas, pero sus cladodios también son consumidos, principalmente en México, el cual es el principal país productor y el que posee una mayor área de este cultivo (Reyes-Agüero et al., 2013; FAO, 2018). Ambas partes son consumidas en fresco, pero también se consumen cocinadas, deshidratadas y procesadas en zumos, mermeladas y siropes, entre otras formas (Sáenz, 2000; FAO, 2018). Además de para consumo humano, la chumbera se ha utilizado para usos medicinales, alimentación animal, producción de biocombustibles y fitorremediación de suelos, entre otros usos (Urrutia-Morales et al., 2014; Escobar-Alvarado et al., 2018).

La pulpa es la parte comestible del fruto y está principalmente compuesta por agua (84-90%) y azúcares como la glucosa y la fructosa (10-15%) (Feugang et al., 2006; Andreu et al., 2018). El fruto contiene un gran número de semillas, aproximadamente 0.24 g g^{-1}, constituyendo el 10-15% de la pulpa y el 30-40 % del peso seco (Feugang et al., 2006; Chougui et al., 2013; FAO, 2018). Se puede obtener un aceite comestible de las semillas del higo chumbo, que es rico en ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados, de los cuales el ácido linoleico es el ácido graso predominante, seguido del ácido oleico (Matthäus y Özcan, 2011; Özcan y Al-Juhami, 2011; De Wit, Hugo y Shongwe, 2018). El consumo de este tipo de ácidos grasos está relacionado con beneficios para la salud y contribuye a la mejora de diversas condiciones de salud como enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes mellitus, entre otras (Rodríguez-Cruz et al., 2005).

Las semillas del higo chumbo suelen descartarse después de la extracción de la pulpa, obteniendo una gran cantidad de semillas como desecho. El estudio de la composición de estas semillas podría ayudar a encontrar posibles usos en las industrias cosmética y farmacéutica, alimentación animal y también en alimentación humana como una fuente novedosa de aceite y harina. Este trabajo se llevó a cabo sobre las semillas de dos cultivares españoles de chumbera. Los principales objetivos de este estudio comparativo fueron cuantificar la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos en estas semillas y determinar el perfil de ácidos grasos y contenido en grasa. Los resultados proporcionarán información específica sobre la composición de las semillas de chumbera y podrían ser valiosos para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica para utilizar este subproducto. Además de sus propiedades beneficiosas para la salud, la chumbera es también un cultivo muy rentable en España, además de contribuir a la mitigación del cambio climático en regiones áridas y semiáridas por secuestro de carbono. El estudio de la composición de las semillas de estos cultivares constituye un avance en el conocimiento de sus propiedades y en la elaboración de productos derivados. Debido a la explotación de sus frutos para la elaboración de productos procesados, se obtiene una gran cantidad de desechos, incluyendo las semillas, que actualmente se utilizan en la alimentación animal. Este trabajo evalúa la composición de las semillas para su uso como complemento alimenticio y la posibilidad de que sean utilizadas en la industria cosmética y farmacéutica.

Material y Métodos

Procesamiento de muestras y material vegetal

Los frutos de los cultivares ‘NO’ y ‘NE’ se recolectaron en la finca experimental de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en la provincia de Alicante, España (02º 03 50 E, 38º03 50 N, y 25 msnm) y fueron identificadas por un botánico experto del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, utilizando el protocolo de García-Rollán (1981). La cosecha de los frutos se realizó durante el verano de 2018 y 2019. Se recolectaron 30 frutos

con el mismo estado de maduración por cultivar y año y se transportaron directamente al laboratorio. Una vez allí, se describieron las características morfológicas de ambos cultivares:

- 'NO': cultivar verde-amarillo, con un peso medio del fruto de 90-120 g.
- 'NE' cultivar verde altamente espinoso, con un peso medio del fruto de 60-80 g.

Una vez en el laboratorio, se retiraron las espinas de los frutos con un cepillo bajo agua del grifo durante 2 min. Tras esto, los frutos se pelaron y la pulpa se cortó en pequeños trozos para posteriormente sumergirla en agua durante una semana para facilitar la separación de las semillas de la pulpa. Pasado este tiempo, se retiró el agua y las semillas se lavaron con agua del grifo durante dos minutos para eliminar la pulpa por completo. Después de eso, las semillas se colocaron en papel secante y se dejaron secar a temperatura ambiente durante diez días y se congelaron a −80 ◦C hasta el momento de los análisis.

Identificación y cuantificación de polifenoles por el método UPLC-PDA-MS

La extracción y determinación de polifenoles se realizó mediante un protocolo descrito anteriormente por Kolniak-Ostek (2016).

La identificación de polifenoles de extractos de las semillas de chumbera se llevó a cabo utilizando un sistema ACQUITY Ultra Performance LC equipado con un detector de matriz de fotodiodos con un administrador de solvente binario (Waters Corporation, Milford, MA, USA) con un detector de masas G2 Q-Tof espectrómetro de micromasa (Waters, Manchester, Reino Unido) equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI) que funciona en modo negativo. La separación de polifenoles individuales se llevó a cabo utilizando una columna UPLC BEH C18 (1,7 mm, 2,1 × 100 mm, aguas) a 30 ºC.

Se inyectaron las muestras (10 µL) y se completó la elución en 15 min con una secuencia de gradientes lineales y caudales constantes de 0,42 mL min^{-1}. La fase móvil constaba de disolvente A (ácido fórmico al 0,1%, v / v) y disolvente B (acetonitrilo al 100%). El gradiente lineal fue el siguiente: 0,0-1,0 min, 99% A, 0,42 ml / min (isocrático), 1,0-12,0 min, 65,0% A, 0,42 ml / min (lineal), 12,0-12,5 min, 99% A, 0,42 ml / min (lineal), 12,5–13,5 min, 99% A, 0,42 ml / min (isocrático). El análisis se llevó a cabo mediante escaneo completo, escaneo de MS dependiente de datos de m/z 100-1500. Se utilizó leucina encefalina como compuesto de referencia a una concentración de 500 pg mL^{-1} y se detectó el ión $[M - H]^-$ a 554,2615 Da. Los iones $[M - H]^-$ se detectaron durante un análisis de 15 minutos realizado dentro de experimentos de masa precisos de ESI-MS, que se introdujeron permanentemente a través del canal LockSpray utilizando una bomba Hamilton. La corrección de la masa de bloqueo fue de ± 1.000 para la ventana de masa. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de iones negativos, se ajustó a los cromatogramas de intensidad de pico base (BPI) y se escaló a 12.400 cuentas por segundo (cps) (100%). Las condiciones de MS optimizadas fueron las siguientes: voltaje capilar de 2500 V, voltaje del cono de 30 V, temperatura de la fuente de 100 ºC, temperatura de desolvatación de 300 ◦C y caudal de gas de desolvatación (nitrógeno) de 300 L h^{-1}.

Se realizaron experimentos de fragmentación inducida por colisión utilizando argón como gas de colisión, con ciclos de aumento de voltaje de 0,3 a 2 V. La caracterización de los componentes individuales se llevó a cabo mediante el tiempo de retención y las masas moleculares precisas. Cada compuesto se optimizó a su masa molecular estimada en modo negativo, antes y después de la fragmentación. Los datos obtenidos de UPLC-MS se introdujeron posteriormente en el software MassLynx 4.0 ChromaLynx Application Manager (Waters).

Las corridas se controlaron en las siguientes longitudes de onda: ácidos fenólicos a 320 nm y glicósidos de flavonol a 360 nm. Los espectros de PDA se midieron en el rango de longitud de onda de

200 a 600 nm en pasos de 2 nm. Los tiempos de retención y los espectros se compararon con los de los estándares auténticos.

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante curvas de calibración externa (R2> 0,999), utilizando compuestos de referencia seleccionados en base al principio de analito/estándar diana relacionado con la estructura (estructura química o grupo funcional). Las soluciones madre estándar se diluyeron a concentraciones apropiadas (se usaron cinco puntos de calibración en cada caso) para el trazado de las curvas de calibración. La linealidad se obtuvo representando gráficamente las áreas de los picos frente a las concentraciones correspondientes (ppm) de cada analito. La curva de calibración del ácido cafeico se utilizó para cuantificar los hexósidos del ácido cafeico. La curva de calibración del ácido ferúlico se utilizó para cuantificar los derivados del ácido ferúlico. El hexósido de ácido protocatecuico se cuantificó con la curva de calibración de ácido protocatecuico.

Las curvas de calibración de quercetina, rutinósido de quercetina y 3-O-galactósido se utilizaron para cuantificar los derivados de quercetina. Para la cuantificación de isorhamnetina, se utilizaron isorhamnetina 3-O-rutinósido y 3-O-glucósido.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (n = 3). Los resultados se expresaron en miligramos por kg de materia seca (MS).

Actividad antioxidante

El potencial antioxidante in vitro total de las muestras se determinó mediante un ensayo de capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) de Benzie y Strain (1996) como medida del poder antioxidante. Las actividades de eliminación de radicales DPPH y ABTS de las muestras se determinaron de acuerdo con el método de Yen y Chen (1995) y Re et al. (1999). Las muestras en polvo (0,5 g) se extrajeron con 10 ml de metanol al 80% acidificado con HCl al 1% (v / v). La extracción se realizó mediante incubación durante 20 min con sonicación (300 W, 40 kHz; Sonic 6D, Polsonic, Varsovia, Polonia) con agitación ocasional. Este método ha demostrado ser adecuado para una extracción completa. A continuación, la suspensión se centrifugó a 19.000 g durante 10 min y el sobrenadante se filtró a través de una membrana hidrófila de PTFE de 0,20 µm (Millex Samplicity Filter, Merck) y se utilizó para el análisis. Se preparó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones de Trolox. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC (Kyoto, Japón). Los resultados se corrigieron por dilución y se expresaron en µmol de Equivalente de Trolox por kg de MS.

Análisis de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos del aceite de semillas fue determinada por GC, de acuerdo con el Método Oficial Ce 1-62 de la Sociedad Estadounidense de Químicos de Aceite (AOAC, 2005). Se utilizó trifluoruro de boro en metanol como agente de metilación. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se analizaron mediante un cromatógrafo de gases Agilent 7820A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipado con una columna capilar RTX-2330, 105 m de longitud, 0,25 mm de di, 0,2 µm de espesor de película (Restek, Bellefonte, PA, EE. UU.). Las temperaturas del inyector y del detector (FID) fueron de 260 ◦C y 280 ◦C, respectivamente. La temperatura de la columna se fijó en 200 ◦C durante 21 min y luego se aumentó a 250 ◦C a una velocidad de 10 ◦C min^{-1}; la temperatura final se mantuvo durante 6 min. Se utilizó helio como gas portador, a un caudal lineal de 35 cm s^{-1}. Los FAME individuales se identificaron utilizando el material de referencia certificado (CRM) 47885 (Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.). Se calcularon las siguientes combinaciones de ácidos grasos: ácidos grasos saturados totales (SFA), ácidos grasos monoinsaturados totales (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados totales (PUFA). Los resultados del contenido en grasa se expresaron en % de ms y los de los ácidos grasos en % del total del perfil de ácidos grasos.

Análisis estadístico

Se utilizaron análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y pruebas de rango múltiple para la comparación de muestras. El método utilizado para discriminar entre las medias (prueba de rango múltiple) fue el procedimiento de diferencia mínima significativa de Tukey. La significancia se definió en *P* 0,05. El análisis estadístico se realizó utilizando el software StatGraphics Plus 5.0 (2000) (Manugistics, Inc., Rockville, MD). Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar.

Resultados y Discusión

Compuestos polifenólicos y actividad antioxidante

Cuatro derivados del ácido ferúlico, dos derivados del ácido cafeico y un derivado de cada uno de los siguientes ácidos: ácido protocateuico, ácido piscídico y ácido eucómico, fueron identificados en las semillas de la chumbera de los cultivares estudiados. Estos y otros ácidos fenólicos habían sido anteriormente identificados en cladodios y frutos de chumbera y sus respectivos zumos (Guevara-Figueroa et al., 2010; Farag et al., 2020). Hasta el momento del estudio, en las semillas de chumbera solo se había identificado el ácido ferúlico (Chougui et al., 2014), mientras que el ácido piscídico, eucómico, protocatecuico y cafeico y sus derivados han sido identificados en las semillas de chumbera por primera vez en este estudio.

Ocho flavonoles fueron detectados en las semillas de los frutos de chumbera: seis derivados de la isorhamnetina y tres de la quercetina. Los compuestos quercetina 3-O-rutinósido y 3-O-galactósido son flavonoides que se encuentran comúnmente en otras plantas y han sido detectados en los frutos (piel y pulpa) (Yeddes et al., 2013a; Farag et al., 2020) y sus respectivos zumos (Mata et al., 2016) y las flores (Yeddes et al., 2013b) de otros cultivares de chumbera, pero no habían sido estudiados previamente en las semillas de esta planta. De la misma forma, los derivados de la isorhamnetina están presentes en flores (De Leo et al., 2010; Yeddes et al., 2013b) pulpa y piel (Yeddes et al., 2013a) de distintos cultivares de chumbera, pero no habían sido identificado en las semillas.

En la Tabla 1 se muestra el análisis cuantitativo de ácidos fenólicos, flavonoles y actividad antioxidante de las semillas de los cultivares de chumbera estudiados. El análisis cuantitativo de estos compuestos mostró diferencias en el contenido de polifenoles entre ambos cultivares. La mayor concentración de ácidos fenólicos y flavonoles se encontró en el cultivar ‘NE’. En ambos cultivares los ácidos fenólicos fueron el grupo dominante de compuestos fenólicos en comparación con los flavonoles, y su cantidad total fue un 17 % mayor. Estos resultados concuerdan con los presentados por Guevara-Figueroa et al. (2010), en cuyo estudio analizaron la concentración de compuestos fenólicos en cladodios comerciales y frutos silvestres. De Wit et al. (2019) obtuvieron valores ligeramente superiores (74,86 mg kg^{-1} – 291,46 mg kg^{-1}) en las semillas de ocho cultivares de chumbera. Estas diferencias pueden deberse a los cultivares, factores genéticos, condiciones de crecimiento, así como al tiempo de recolección, el grado de madurez, el procesamiento de la fruta y, sobre todo, los métodos de determinación (De Wit et al., 2019). Los resultados obtenidos muestran que la proporción y concentración de compuestos fenólicos en las plantas dependen de la parte anatómica. La variabilidad de los compuestos fenólicos en los tejidos vegetales depende de muchos factores, como la temperatura, la luz ultravioleta y la nutrición (Markham et al., 1998; Rivero et al., 2001; Rühmann et al., 2002).

La mayor actividad antioxidante in vitro determinada por los tres métodos se observó en el cultivar ‘NE’. Los resultados de estos parámetros fueron ligeramente inferiores a los reportados por otros autores en los frutos (piel y pulpa) y cladodios de chumbera (Andreu et al., 2018). Estas diferencias

pueden deberse que fueron estudiadas distintas partes anatómicas de la chumbera. Los polifenoles desempeñan un importante papel en la actividad antioxidante, en particular en la eliminación de DPPH (Trantis et al., 2005; Kivrak et al., 2009). La actividad antioxidante in vitro de las semillas estudiadas se correlacionó positivamente con la cantidad de compuesto polifenólicos. Los resultados obtenidos muestran un alto coeficiente de correlación entre el contenido de compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante in vitro determinada por los métodos DPPH, ABTS y FRAP (R^2 = 0,77 para DPPH, 0,71 para ABTS y 0,73 para FRAP). Los polifenoles juegan un importante papel en la actividad antioxidante y su poder para eliminar radicales libres depende de su estructura y del grupo al que pertenecen (Eberhardt, Lee y Liu, 2000; Dudonneé et al., 2009; Floegel et al, 2011). Estos resultados concuerdan con los presentados por otros autores (Chougui et al., 2013; Farag et al., 2020).

Tabla 1. Análisis cuantitativo de ácidos fénolicos y flavonoles (mg kg-[1] de materia seca) y actividad antioxidante in vitro (mMol Trolox kg^{-1} de materia seca) de las semillas los dos cultivares de chumbera estudiados

[mg kg^{-1}]	NE	NO
Ácidos fenólicos		
Hexósido de ácido protocatecuico	22,36 ± 1,1 b[†]	11,24 ± 0,2 a
Derivado del ácido ferúlico	0,00 ± 0,0 a	1,08 ±0,0 b
Hexósido del ácido cafeico I	12,59 ± 0,2 b	4,09 ± 0,1 a
Diglucósido del ácido ferúlico	108,97 ± 3,5 b	13,59 ± 1,0 a
Hexósido de ácido cafeico II	1,54 ± 0,0 a	2,40 ± 0,0 b
Ácido feruloil glucónico	14,21 ± 0,5 b	2,20 ± 0,1 a
Derivado del ácido ferúlico	11,93 ± 0,2 b	4,69 ± 0,2 a
Suma de ácidos fenólicos	171,60	39,29
Flavonoles		
Quercetina	0,90 ± 0,0 a	1,52 ± 0,1 b
Quercetina-3-O-rutinósido	8,34 ± 0,2 b	4,18 ± 0,1 a
Quercetina-3-O-galactósido	3,58 ± 0,1 b	2,62 ± 0,0 a
Isorhamnetina-pentosil-rutinósido	3,71 ± 0,1 a	3,92 ± 0,1 a
Isorhamnetina-pentosil-ramnósido	0,86 ± 0,0 b	0,12 ± 0,0 a
Isorhamnetina-3-*O*-rutinósido	1,59 ± 0,0 b	0,64 ± 0,0 a
Isorhamnetina-3-*O*-galactósido	3,31 ± 0,1 b	0,61 ± 0,0 a
Isorhamnetina-3-*O*-glucósido	51,03 ± 1,6 b	12,75 ± 0,6 a
Hexósido acilado de isorhamnetina	21,74 ± 1,1 b	3,46 ± 0,1 a
Suma de flavonoles	95,07	29,83
Total	266,67	69,13
Actividad antioxidante [mMol Trolox kg^{-1}]		
DPPH	4,99 ± 0,0 b	2,57 ± 0,0 a
ABTS	11,67 ± 0,2 b	9,97 ± 0,1 a
FRAP	8,89 ± 0,1 b	6,86 ± 0,1 a

[†] Media ± error estándar (n=6). Los valores seguidos de la misma letra, dentro de la misma fila, no fueron significativamente distintos según el test de Tukey ($p \leq 0,05$)

Ácidos grasos y contenido en grasa

En la tabla 2 se muestra la composición de ácidos grasos (% del perfil total de ácidos grasos) y el contenido en grasa (%) de las semillas de chumbera de los cultivares analizados. El cultivar 'NO' mostró el contenido en grasa más elevado. De Wit, Hugo y Shongwe (2018) obtuvieron valores ligeramente más elevados (hasta el 8,76%) en cultivares sudafricanos, mientras que Labuschagne y Hugo (2010) obtuvieron valores más bajos (2,29%-5,59%). Estas diferencias pueden ser debidas a condiciones de crecimiento, cultivo, factores genéticos, así como al tiempo de recolección, el grado de madurez o el procesamiento de la fruta (De Wit,Hugo y Shongwe, 2018). Se determinó que el aceite de las semillas de estos dos cultivares de chumbera estaba compuesto principalmente por ácidos grasos insaturados, incluidos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) como el ácido linolénico, y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), principalmente ácido oleico, con una fracción menor pero significativa de ácidos grasos saturados (SFA). En total, se identificaron y evaluaron trece ácidos grasos, siendo el dominante el ácido linoleico en ambos cultivares. El contenido en PUFA fue más elevado en el cultivar 'NE'. Ciriminna et al. (2017) observaron niveles similares de PUFA en el aceite extraído de las semillas de cultivares sicilianos. En cuanto a los MUFA, el ácido oleico se encontró en una mayor cantidad, y su concentración fue más elevada en el cultivar 'NE'. Los ácidos grasos saturados dominantes fueron el ácido palmítico y el ácido esteárico, y ambos se encontraron en menor concentración en el cultivar 'NE'. Las diferencias observadas entre los cultivares analizados podrían estar relacionadas con factores genéticos.

Tabla 2. Contenido en grasa (%) y composición de ácidos grasos (% del perfil total de ácidos grasos) de las semillas de chumbera de los dos cultivares estudiados

	NE	**NO**
Contenido en grasa (%)	5,24 ± 0,3 a	7,69 ± 0,2 b
Ácidos grasos		
Ácido mirístico (C 14:0)	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a
Ácido palmítico (C 16:0)	12,47 ± 0,41 a	14,33 ± 0,26 b
Ácido palmitoleico (C 16:1)	0,78 ± 0,12 a	0,85 ± 0,25 a
Ácido margárico (C 17:0)	0,03 ± 0,01 a	0,02 ± 0,01 a
Ácido esteárico (C 18:0)	2,56 ± 0,21 a	4,00 ± 0,27 b
Ácido oleico (C 18:1)	19,37 ± 0,37 a	21,64 ± 0,41 b
Ácido linoleico (C 18:2)	63,11 ± 0,82 b	57,72 ± 0,70 a
Ácido linolénico (C 18:3)	1,10 ± 0,19 b	0,89 ± 0,20 a
Ácido arquídico (C 20:0)	0,19 ± 0,03 a	0,20 ± 0,02 a
Ácido gondoico (C 20:1)	0,11 ± 0,01 a	0,12 ± 0,01 a
Ácido eicosatrienoico (C 20:3)	0,12 ± 0,01 a	0,13 ± 0,02 a
Ácido behénico (C 22:0)	0,12 ± 0,01 a	0,08 ± 0,01 a
Ácido lignocérico (C 24:0)	0,03 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a
MUFA	20,26 ± 0,32 a	22,61 ± 0,29 b
PUFA	64,33 ± 0,50 b	58,74 ± 0,62 a
SFA	15,41 ± 0,31 a	18,65 ± 0,45 b

† Media ± error estándar (n=6). Los valores seguidos de la misma letra, dentro de la misma fila, no fueron significativamente distintos según el test de Tukey ($p \leq 0,05$)

Conclusiones

La investigación realizada ha demostrado que las semillas de chumbera (*O. ficus-indica* (L.) Mill) son una excelente fuente de sustancias promotoras para la salud como lo son los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados y los compuestos fenólicos. Debido a su alto contenido en compuestos fenólicos, se caracterizan por tener fuertes propiedades antioxidantes. Las semillas de la chumbera normalmente se desechan después de la extracción de la pulpa, proporcionando una gran cantidad de semillas como desecho. Estas semillas se podrían utilizar como una fuente de bajo coste de compuestos promotores de la salud. Además, esto contribuiría reducir la cantidad de residuos generados durante el proceso de producción.

Bibliografía

Andreu, L.; Nuncio-Jáuregui, N.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Legua, P.; Hernández, F., 2018. Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish Opuntia ficus-indica Mill. cladodes and fruits. J. Sci. Food Agric. 98, 1566–1573. https://doi.org/10.1002/jsfa.8628

AOAC., 2005.Official Methods of Analysis of AOAC International; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, USA.

Benzie, I.F.F.; Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal. Biochem. 239, 70–76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

Chougui, N.; Tamendjari, A.; Hamidj, W.; Hallal, S.; Barras, A.; Richard, T.; Larbat, R. 2013. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of Opuntia ficus-indica seeds. Food Chem. 139, 796–803. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.054

Ciriminna, R.; Bongiorno, D.; Scurria, A.; Danzì, C.; Timpanaro, G.; DeLisi, R.; Avellone, G.; Pagliaro, M., 2017. Sicilian Opuntia ficus-indica seed oil: Fatty acid composition and bio-economical aspects. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 119, 1700232. https://doi.org/10.1002/ejlt.201700232

De Leo, M.; De Abreu, M.B.; Pawlowska, A.; Cioni, P.; Braca, A., 2010. Profiling the chemical content of Opuntia ficus-indica flowers by HPLC–PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. Phytochem. Lett. 3, 48–52. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2009.11.004

De Wit, M.; Hugo, A.; Shongwe, N. 2018. South African Cactus Pear Seed Oil: A Comprehensive Study on 42 Spineless Burbank Opuntia ficus-indica and Opuntia robusta Cultivars. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2018, 120, 1700343. https://doi.org/10.1002/ejlt.201700343

De Wit, M.; Du Toit, A.; Osthoff, G.; Hugo, A., 2019. Cactus pear antioxidants: A comparison between fruit pulp, fruit peel, fruit seeds and cladodes of eight different cactus pear cultivars (Opuntia ficus-indica and Opuntia robusta). J. Food Meas. Charact. 13, 2347–2356. https://doi.org/10.1007/s11694-019-00154-z

Dudonneé, S.; Vitrac, X.; Coutieère, P.; Woillez, M.; Meérillon, J.M., 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. J. Agric. Food Chem. 57, 1768–1774. https://doi.org/10.1021/jf803011r

Eberhardt, M.V.; Lee, C.Y.; Liu, R.H., 2000. Antioxidant activity of fresh apples. Nature, 405, 903–904. https://doi.org/10.1038/35016151

Escobar-Alvarado, L.F.; Vaca-Mier, M.; López, R.; Rojas-Valencia, M.N., 2018. Hydrocarbon Degradation and Lead Solubility in a Soil Polluted with Lead and Used Motor Oil Treated by Composting and Phytoremediation. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 100, 280–285. https://doi.org/10.1007/s00128-017-2211-6

FAO, Food and Agricultural Organization, 2018.Ecologia del Cultivo, Manejo y Usos del Nopal; Inglese, P., Mondragon, C., Nefzaoui, A., Sáenz, C., Eds.; FAO: Rome, Italy, 2018.

Farag, M.A.; Sallam, I.E.; Fekry, M.I.; Zaghloul, S.S.; El-Dine, R.S., 2020. Metabolite profiling of three Opuntia ficus-indica fruit cultivars using UPLC-QTOF-MS in relation to their antioxidant potential. Food Biosci. 36, 100673. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100673

Feugang, J.M., 2006. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (Opuntia spp.) cladodes and fruits. Front. Biosci. 11, 2574–2589. https://doi.org/10.2741/1992

Floegel, A.; Kim, D.-O.; Chung, S.-J.; Koo, S.I.; Chun, O.K.,2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. J. Food Compos. Anal. 24, 1043–1048. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008

García-Rollán, M. 1981. Claves de la flora de España (Península y Baleares), Pteridofitas, Gimnospermas, Dicotiledoneas (A-J); Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, Spain; Volume 1.

Guevara-Figueroa, T.; Jiménez-Islas, H.; Reyes-Escogido, M.L.; Mortensen, A.G.; Laursen, B.B.; Lin, L.-W.; De Leon-Rodriguez, A.; Fomsgaard, I.S.; De La Rosa, A.P.B., 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (Opuntia spp.). J. Food Compos. Anal. 23, 525–532. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.003

Kivrak, I.; Duru, M.E.; Öztürk, M.; Mercan, N.; Harmandar, M.; Topcu, G., 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of Salvia potentillifolia. Food Chem. 116, 470–479. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.069

Kolniak-Ostek, J., 2016. Chemical composition and antioxidant capacity of different anatomical parts of pear (Pyrus communis L.). Food Chem. 203, 491–497. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.103

Labuschagne, M.T.; Hugo, A., 2010. Oil content and fatty acid composition of cactus pear seed compared with cotton and grape seed. J. Food Biochem. 34, 93–100. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00266.x

Markham, K.R.; Ryan, K.G.; Bloor, S.J.; Mitchell, K.A., 1998. An increase in the luteolin: Apigenin ratio in Marchantia polymorpha on UV-B enhancement. Phytochemistry 48, 791–794. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00875-3

Mata, A.; Ferreira, J.P.; Semedo, C.; Serra, T.; Duarte, C.M.M.; Bronze, M.R., 2016. Contribution to the characterization of Opuntia spp. juices by LC–DAD–ESI-MS/MS. Food Chem. 210, 558–565. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.033

Matthäus, B.; Özcan, M.M., 2011. Habitat effects on yield, fatty acid composition and tocopherol contents of prickly pear (Opuntia ficus-indica L.) seed oils. Sci. Hortic. 131, 95–98. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.027

Özcan, M.M.; Al-Juhaimi, F.Y., 2011. Nutritive value and chemical composition of prickly pear seeds (Opuntia ficus indica L.) growing in Turkey. Int. J. Food Sci. Nutr. 62, 533–536. https://doi.org/10.3109/09637486.2011.552569

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free. Radic. Biol. Med. 26, 1231–1237. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Reyes-Agüero, J.A.; Rivera, J.R.A.; Carlín-Castelán, F.; González-Durán, A., 2013. Diversity of wild and cultivated opuntia variants in the meridional highlands plateau of Mexico. Acta Hortic. 995, 69–74. 10.17660/ActaHortic.2013.995.8

Rivero, R.M.; Ruiz, J.M.; García, P.C.; López-Lefebre, L.R.; Sánchez, E.; Romero, L., 2001. Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. Plant Sci. 160, 315–321. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2

Rodríguez-Cruz, M.; Tovar, A.; del Prado, M.; Torres, N., 2005. Mecanismos moleculares de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios. Rev. Invest. Clínic. 57, 457–472. Available online: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000300010 (accessed on 1 August 2020).

Rühmann, S.; Leser, C.; Bannert, M.; Treutter, D., 2002. Relationship Between Growth, Secondary Metabolism, and Resistance of Apple. Plant Biol. 4, 137–143. https://doi.org/10.1055/s-2002-25727

Saenz, C., 2000. Processing technologies: An alternative for cactus pear (Opuntia spp.) fruits and cladodes. J. Arid. Environ. 46, 209–225. https://doi.org/10.1006/jare.2000.0676

Triantis, T.; Stelakis, A.; Dimotikali, D.; Papadopoulos, K., 2005. Investigations on the antioxidant activity of fruit and vegetable aqueous extracts on superoxide radical anion using chemiluminescence techniques. Anal. Chim. Acta. 536, 101–105. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.048

Urrutia-Morales, J.; Gámez-Vázquez, H.G.; Beltrán-López, S.; Díaz-Gómez, M.O., 2014. Use of Atriplex canescens and Opuntia ficus indica as feed for lactating goats during drought. Agronomía Mesoamericana 2014, 25, 287–296. https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15431.

Yeddes, N.; Chérif, J.K.; Guyot, S.; Sotin, H.; Ayadi, M.T., 2013a. Comparative Study of Antioxidant Power, Polyphenols, Flavonoids and Betacyanins of the Peel and Pulp of Three Tunisian Opuntia Forms. Antioxidants 2013a, 2, 37–51. https://doi.org/10.3390/antiox2020037

Yeddes, N.; Chérif, J.K.; Guyot, S.; Baron, A.; Trabelsi-Ayadi, M., 2013b. Phenolic Profile of Tunisian Opuntia Ficus Indica Thornless form Flowers via Chromatographic and Spectral Analysis by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography-UV-Photodiode Array and Electrospray Ionization-Mass Spectrometer. Int. J. Food Prop. 17, 741–751. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.665404

Yen, G.-C.; Chen, H.-Y., 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. 43, 27–32. https://doi.org/10.1021/jf00049a007

ÍNDICE DE AUTORES

Autor	*Páginas**
• N. Abu-Khalaf	373
• M.S. Alamansa	76
• T. Albán-Guerrero	226
• N. Alburquerque	28
• A. Alonso	44,51,57
• C. Álvarez	**288, 351**
• M. Alvarez-Henao	**590**
• F.J. Álvarez-Martínez	237
• A. Amorós	76
• M.J. Argente	179
• M.V. Arias	**123**
• A.D. Asencio	207
• A. Atzori	195
• F. Badiche	**114,** 573
• A. Baptista	57
• E. Barrajón-Catalán	237
• A. Beltrán	472
• R. Bermúdez	481
• E. Bernabé-García	**524**
• M.P. Bernal	288
• P. Bersano-Reyes	**630**
• I. Blanco-Gutiérrez	162
• Z. E. Blesa	**321**
• F. Borrás-Rocher	237
• C. Botella-Martínez	452, **491**
• J. Bueso	195
• L. Burgos	28
• S. Buri	309
• F. Burló	84
• M. A. Bustamante	351
• J.A. Cabrera	44, **51,** 579
• J.M. Cámara-Zapata	410
• M. Cano-Lamadrid	472, 612

En negrita artículo como autor principal

- P. Carbonell **44, 51**
- A. A. Carbonell-Barrachina 226
- L. Carrera-Beltrán **226, 309**
- A. Carrión Antolí **123, 573**
- S. Castillo 114, 553, 573
- M.I. Cerón-Guevara **481**
- J. Chazarra Zapata 420
- A. Cisterne-López 403
- R. Clemente 288
- A. M. Codes-Alcaraz **553**
- S. Colino Jiménez **392**
- A. Conesa Celdrán 373
- A. Del Cerro **563**
- G. Díaz 114, 207, 257, **268**
- J.R. Díaz 195
- A. Dobón-Suarez 34,133, 553
- C. Egea-Guilabert 351
- P.J Escolano 144
- J. Estong **263**
- M.A. Falcón **444**
- V. Fernández 268
- M.T. Fernández 298,341
- J.A. Fernández 351
- A. Fernández López **373**
- J. Fernández-Álvarez 491
- M. Fernández-Villena 361, 373
- N.J. Flores-Duarte 216,247
- M.J. Frutos 601
- A. Galindo 66
- J.V. García 216
- S. García 76, 351
- M.L. García 179
- S. García-Martínez 44, 51,**57**

En negrita artículo como autor principal

- M.E. García-Pastor 34,133,144, 543, 553
- A. García-Rández **341**
- F. Garrido **504**
- I. Gavilanes-Terán 226, 309
- A. Gea-Quesada **452**
- J. Gerth **621**
- M.J. Giménez 133, 144,543, 563, 579, 621
- M. Giménez 34
- M. Giménez-Berenguer **579**
- N. Godoy 154
- A. Gómez 44, 57
- P.G. González 186
- E. González María **382**
- I. González-Sánchez **84**
- A. Grao-Ruiz **94**
- A. Grau 44,51
- M. Grimalt **76**
- M.C. Guamán- Balcázar 464
- F. Guillén 257, 524, 533, 573
- P. Guirao 57
- F. Hernández 57,66,76
- J. Idrovo-Novillo 226
- K.A. Igler 472
- M.I.M. Ilea **533**
- D. S. Intrigliolo 403
- C. Jiménez-Cartagena 590
- N. Jiménez-Redondo **612**
- M. Juárez 57
- P. Legua 76
- J. Londoño-Londoño 590
- F. López Peñaver **420**
- E. López-Martínez **601**
- J.M. Lorente 123,171, 573
- J.M. Lorente-Mento 257, 504
- J.M. Lorenzo 481
- M. Losada-Echeberría 237

En negrita artículo como autor principal

- L. Luna 162
- A. A. Luna **186**
- P. Manzares 514
- A. Mañuelo Luna 382
- J.F. Marcos 514
- M.P. Marí **207**
- N. Martí 104
- M.Á. Martínez **104**
- J. Martínez Sánchez **432**
- L. Martínez-Carrasco 154, 432
- D. Martínez-Romero 114
- E. Martínez-Sabater 104, 334
- E. Mateos-Naranjo 216, 247
- O. Medina **298**
- J.A. Medina **66**
- A. Melián Navarro 392, 420
- F. A. Méndez 186
- S. Merino 216
- J. Mesa-Marín 216, 247
- C. Molina Cabreral 373
- J.M. Molina-Martínez 403
- P. Monllor **195**
- R. Moral 298, 321, 334, 341,351
- L. Morocho **464**
- R. Muelas 195
- S. Navarro-Torre 247
- M. Nicolás **257**
- M. Nicolás-Almansa 533
- G. Nieto-Martínez 630
- L. Noguera-Artiaga 57, 84, 94
- M. Oates 373
- V. Origüela 28
- A.M. Ortega 57

En negrita artículo como autor principal

- E. Pajuelo 216
- C. Paredes 104,226, 279, 309
- M.M. Paricio-Caño **361**
- D. Parras-Burgos 403
- J.A. Pascual 351
- M. Pateiro 481
- M. Pedraza-Torres 321
- M.D. Pérez 298
- A. Pérez Espinosa 298, 334
- J.A. Pérez-Álvarez 491
- C. Pérez-Caselles **28**
- M.D. Pérez-Murcia 341
- J. Pérez-Pérez 237
- R. Pesci de Almeida **472**
- J. Piernas-Párraga 94
- M.T. Pretel 171,207
- H. Puerto-Molina 410
- J. Ramos 373
- E. Rangel-Vargas 481
- D. Raus de Baviera **237**
- S. Redondo-Gómez 216
- J.F. Reyes 464
- A. Roca 195
- M. Ródenas **543**
- J.A. Rodríguez 481
- A. Rodríguez **34**
- S. Rodriguez-Cámara 410
- I.D. Rodríguez-Llorente 216, 247
- E. Romano **216**
- G. Romero 195
- C. Ropero **514**
- A. Ros Almena **154**
- M.J. Rubio-Martínez **144**
- B. Ruiz **179**
- J.J. Ruiz 44,51,57
- A. Ruiz Canales 237, 373, 382, 392, 420
- M.C. Ruiz-Aracil 524, 533

En negrita artículo como autor principal

- C. Ruiz-Aracil 257
- S. Ruiz-Illapa 226
- J. Sáez 334
- J.A. Sáez 321
- P. Saiz **162**
- K. Salazar 309
- J.F. Salinas 44,51
- J.M. Sánchez 57
- S. Sánchez Méndez **334**
- J.C. Sánchez-Hernández 321
- I. Sánchez-Ortega 481
- J.M. Sánchez-Roldán 44
- C.A. Sandoval 186
- C. Santiago-Cubas **279**
- E.M. Santos 481
- E. Sayas-Barberá 452
- E. Sendra 195, 472
- V. Serna-Escolano 144
- M. Serrano 114,123,171, 504, 573
- J. Solano-Jimenez **410**
- M. Soler-Méndez **403**
- J.F.J. Torres 186
- P. Torres 268
- A. Valdés 472
- J.L. Valenzuela **18**
- D. Valero 114,123, 504, 573
- E. Valero-Cases 601
- J.M. Valverde 114, 257, 524, 533, 612
- V.H. Valverde **309**
- V.H. Valverde-Orozco 226
- M. Viuda-Martos 452,491
- P. J. Zapata 34, 94, 123,133, 543, 563, 579, 621

En negrita artículo como autor principal