



Universidad Politécnica de Cartagena
Departamento de Producción Vegetal

**EFFECTO DEL RIEGO DEFICITARIO SOSTENIDO SOBRE EL COLOR Y LAS
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ZUMO DE GRANADA**

Trabajo Fin de Grado

Laura Navarro Segura

2014



Efecto del riego deficitario sostenido sobre el color y las características químicas del zumo de granada

Laura Navarro Segura

Directores: Jacinta Collado González

Alejandro Galindo Egea

Proyecto Fin de Grado en Ingeniería de la Industria Agroalimentaria.

Universidad Politécnica de Cartagena

Cartagena, 2014

EFFECTO DEL RIEGO DEFICITARIO SOSTENIDO SOBRE EL COLOR Y LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ZUMO DE GRANADA

Memoria presentada como Proyecto Fin de Grado en Ingeniería de la Industria
Agroalimentaria. Universidad Politécnica de Cartagena,

Laura Navarro Segura

V^oB^o

Los Directores

V^oB^o

El Tutor

Jacinta Collado González

Becario FPI

Alejandro Galindo Egea

Becario FPU

Juan Antonio Martínez López

Profesor Colaborador de la UPCT



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

**AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL PROYECTO FIN DE
CARRERA POR LOS DIRECTORES**

Alejandro Galindo Egea y Jacinta Collado González

Autorizan:

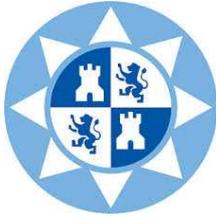
La presentación de la memoria titulada: **“Efecto del riego deficitario sostenido sobre el color y las características químicas del zumo de granada”**, realizada por Dña. Laura Navarro Segura bajo nuestra dirección y supervisión, en el Departamento de Riego del Centro de Edafología y Biología Aplicada al Segura (CEBAS), y que presenta como Proyecto Fin de Grado en Ingeniería de la Industria Agroalimentaria en la Universidad Politécnica de Cartagena

En Cartagena, a 30 de Abril de 2014.

Los Directores del Proyecto

Lda. Jacinta Collado González

Ing. Alejandro Galindo Egea



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Departamento de Producción Vegetal

Paseo Alfonso XIII, 48.30203 Cartagena

Juan Antonio Martínez López, Profesor Colaborador de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT),

EXPONE

Que ha actuado como tutor del Proyecto Fin de Grado “Efecto del riego deficitario sostenido sobre el color y las características químicas del zumo de granada”, realizado por la alumna Laura Navarro Segura bajo la dirección de la Lda. Jacinta Collado González y el Ing. Alejandro Galindo Egea del CEBAS (CSIC), habiendo seguido su desarrollo y revisado su contenido y, por tanto

AUTORIZA

Su presentación para la obtención del título de graduada en Ingeniería de la Industria Agroalimentaria, por la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT).

Cartagena, 30 de Abril de 2014

ÍNDICE

	<u>Página</u>
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 <i>Material vegetal, Condiciones experimentales y Tratamientos</i>	
2.2 <i>Climatología y Estado hídrico de la planta</i>	
2.3 <i>Muestras de zumo de granada</i>	
2.4 <i>Parámetros de calidad en zumos</i>	
2.5 <i>Colorimetría</i>	
2.6 <i>Identificación y cuantificación de componentes fenólicos</i>	
2.7 <i>Capacidad antioxidante ABTS⁺</i>	
2.8 <i>Diseño y análisis estadístico</i>	
RESULTADOS	22
3.1 <i>Estado hídrico de la planta</i>	
3.2 <i>Atributos de calidad y parámetros de color</i>	
3.3 <i>Compuestos químicos y actividad antioxidante</i>	
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

Se ha realizado este estudio debido a que no existe información de cómo afecta el estrés hídrico al cultivo de granado (*Punica granatum* L.) en términos de calidad y de propiedades nutricionales/ saludables del zumo de sus frutos. En dicho estudio se evaluó la influencia de dos tratamientos diferentes de riego deficitario sostenido sobre el color, actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales, contenido total de antocianinas, punicalaginas y contenido de ácido elágico del zumo de granada.

Las plantas control fueron regadas al 75% de ET_0 (evapotranspiración de referencia) con el fin de garantizar las condiciones no limitantes de agua en el suelo, mientras que las plantas de los otros dos tratamientos fueron sometidas a un riego deficitario sostenido al 43 y al 12% de ET_0 , respectivamente, durante todo el período experimental. Ambos tratamientos, tanto el sometido a estrés moderado (43%) como el sometido a estrés severo (12%), produjeron un zumo de granada con características similares, siendo éstas, un color más amarillento, una menor actividad antioxidante y un menor contenido en compuestos fenólicos totales, punicalaginas y antocianinas totales con respecto a los resultados obtenidos para las plantas control.

El zumo obtenido de las frutas de los granados sometidos a un riego deficitario sostenido era de menor calidad y menos saludable que el de los granados que no fueron sometidos a estrés hídrico. Desde un punto de vista nutricional, esto significa que una reducción en el riego proporciona una disminución drástica en los compuestos fenólicos bioactivos, especialmente antocianinas y punicalaginas, y en consecuencia una menor atracción visual del zumo de granada debido al débil color rojo resultante.

ABSTRACT

No information exists on the consequences of water stress on the pomegranate (*Punica granatum* L.) tree in terms of the quality and health/nutritional properties of its juice. In this study the influence of two different sustained deficit irrigation treatments on the colour, antioxidant activity and total phenolic compound, total anthocyanin, punicalagin and ellagic acid contents of pomegranate juice was assessed.

Control plants were irrigated at 75% ET_o (crop reference evapotranspiration) in order to ensure non-limiting soil water conditions, while others were subjected to sustained deficit irrigation at 43 and 12% ET_o throughout the experimental period. Both moderate (43%) and severe (12%) water stress treatments led to pomegranate juices with a more yellowish colour, lower antioxidant activity and lower total phenolic compound, punicalagin and total anthocyanin contents than those from control plants.

Pomegranate juice from trees under sustained deficit irrigation was of lower quality and less healthful than that from trees without water stress. From a nutritional point of view, this means that a reduction in irrigation provides a dramatic decrease in bioactive phenolic compounds, especially anthocyanins and punicalagin, and consequently a lower visual attraction of the juice owing to the weak red colour of the fruit.

EFFECTO DEL RIEGO DEFICITARIO SOSTENIDO SOBRE EL COLOR Y LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ZUMO DE GRANADA

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos treinta años los períodos de sequía han afectado a un 17% del territorio europeo y a un 11% de la población, causando pérdidas de hasta 100 billones de Euros (Collins et al. 2009). A pesar de este hecho, los agrosistemas mediterráneos deben afrontar la necesidad de encarar la escasez de agua, debido a que cualquier política de expansión continua del suministro es insostenible (Pereira et al. 2002). A consecuencia de este hecho, se considera llevar a cabo lo que puede ser una opción importante en la fruticultura de agrosistemas mediterráneos que es el empleo de un material vegetal caracterizado por ser menos demandante de agua y por consiguiente más resistente al estrés hídrico. Además de contemplar el uso de este material vegetal es necesario considerar un factor crítico en este contexto que es la aplicación sobre dicho material de un déficit de riego, el cual debe estar programado con el fin de no sólo permitir un ahorro considerable de agua, sino que además de ocasionar un impacto mínimo sobre la producción de la planta debe permitir obtener una producción rentable de frutas de alta calidad.

El granado (*Punica granatum* L.) pertenece a la familia *Lythraceae*. Crece como arbusto frondoso que puede alcanzar los 3,7 m de altura, con ramas espinosas y delgadas. Las flores tienen la corola en forma tubular y son

de color rojo brillante. (El mundo de las plantas, Botanical-online; Guía de consultas diversidad vegetal, Universidad de Navarra).



Figura 1: Fruto del granado (*Punica granatum* L.)

Este árbol frutal es muy interesante, desde el punto de vista agronómico, ya que presenta características de tolerancia a la sequía, comunes entre las plantas xeromórficas, como es el alto contenido relativo de agua apoplástica en la hoja, y la capacidad para hacer frente a la escasez de agua mediante el desarrollo complementario de mecanismos de prevención y tolerancia al estrés (Rodríguez et al. 2012). Por estas razones, este cultivo resistente a la sequía soporta el calor y crece bien en zonas áridas y semiáridas, incluso bajo condiciones desérticas (Aseri et al. 2008; Sarkhosh et al. 2006). Desde el punto de vista nutricional, se sabe que los frutos del granado son bayas grandes con una elevada parte comestible, la cual es una fuente de muchos compuestos valiosos para la salud, tales como los taninos hidrolizables (punicalaginas y punicalinas) (Gil et al. 2000), taninos condensados (proantocianidinas) (Poyrazoğlu et al. 2002), antocianinas (Hernández et al. 1999) y ácidos fenólicos (ácidos gálico y ácido elágico) (Gil et al. 2000). Estos compuestos,

además de mostrar un gran impacto sobre los parámetros de calidad y una alta actividad antioxidante, presentan un gran número de efectos beneficiosos para la salud relacionados con el estrés oxidativo, como son el cáncer, enfermedades cardiovasculares y la neurodegeneración (Mena et al. 2011).

A pesar de la crucial importancia que ha adquirido la escasez de agua en la mayoría de las regiones del mundo adecuadas para el cultivo y crecimiento del granado, no existe apenas información sobre el efecto del riego sobre su productividad y a las características de los frutos. Una excepción es el trabajo de Mellisho et al. (2012) donde los autores pusieron de manifiesto que el uso del riego deficitario induce a una disminución en el crecimiento del fruto, obteniéndose así frutos de menor tamaño, una menor producción total y algunos cambios tanto en su coloración como en sus características químicas, lo cual refleja una maduración temprana del fruto. Sin embargo, todavía no se ha llevado a cabo ningún estudio de cómo afecta el riego deficitario sobre el contenido de compuestos fenólicos en zumo de granada.

Es importante considerar la relación de Horner (1990), la cual pone de manifiesto que el efecto del estrés hídrico sobre la composición fenólica de un fruto es considerado, a menudo, como inconsistente y muy confuso, ya que previamente se ha informado que dicho efecto puede causar tanto aumentos como disminuciones en la concentración de diversos componentes fenólicos.

Por estas razones, el presente estudio tiene como objetivo examinar los efectos de diferentes tratamientos de riego deficitario prolongado sobre el color, actividad antioxidante y compuestos fenólicos, punicalagina y ácido elágico en zumo de granada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Material vegetal, condiciones experimentales y tratamientos*

El ensayo experimental se llevó a cabo en 2011 en una finca ubicada cerca de la ciudad de Murcia, España (37° 47' N, 1° 25' W). El material vegetal consistió en granados adultos sin porta injertos (*P. granatum* L.) cv. Mollar de Elche. El marco de plantación utilizado en este estudio presentó un espacio entre árboles de 5m x 3m.

El suelo de la plantación es un suelo Hyposalic Calciorthid moderadamente salino (5,9 dsm⁻¹), con una textura franco-limosa, con un contenido moderado de cal (200 g de carbonato de calcio kg⁻¹), con un contenido muy bajo contenido de materia orgánica (11 g kg⁻¹), una baja capacidad de intercambio catiónico (93.2 meqkg⁻¹), bajo nivel de potasio disponible y alto nivel de fósforo disponible.

El agua de riego utilizada presentó una conductividad eléctrica entre 0,8 y 1,0 dS m⁻¹. El contenido de Cl⁻ en el agua de riego varió desde 59 hasta 73 mgL⁻¹ durante el período experimental. El control parasitario fue el utilizado generalmente por los productores locales, no permitiendo el crecimiento de malas hierbas dentro de la huerta.

Desde el día 11 de abril (día del año (DA) 101) al 14 de octubre (DA 287), el riego se llevó a cabo diariamente durante la noche por medio de un sistema de riego por goteo usando un único lateral por fila de árboles, utilizando tres emisores de 4 L h⁻¹ por planta.

Para llevar a cabo este trabajo se realizaron tres tratamientos de riego; dichos tratamientos consisten en un tratamiento control (T0), en el cual las plantas se regaron al 75% de ET_0 (evapotranspiración de referencia en cultivos) con el fin de garantizar condiciones no limitantes de agua en el suelo, y los tratamientos T1 y T2, en los que las plantas fueron sometidas a un riego deficitario prolongado del 43 y 12% de ET_0 respectivamente, durante todo el periodo experimental.

Con el fin de suministrar la misma cantidad de fertilizante a todos los árboles de cada tratamiento, estos se aplicaron mediante fertirrigación (fertilizantes + agua) a los árboles de los tres tratamientos sólo durante el período del riego realizado en plantas sometidas al tratamiento T2. Antes de la fertirrigación, los árboles de los tratamientos T0 y T1 recibieron sólo agua. Las cantidades totales de agua aplicadas fueron 776, 448 y 119 mm para los tratamientos T0, T1 y T2, respectivamente.

2.2. Climatología y estado hídrico de la planta

En una estación meteorológica ubicada en la finca se recogieron de manera automática, cada 15 minutos, los datos micrometeorológicos nombrados a continuación: temperatura del aire, radiación solar, humedad relativa del aire, pluviosidad y una velocidad del viento de 2 m por encima de la superficie del suelo.

El importante déficit de presión de vapor del aire medio diario (DPV_{md}) se calculó de acuerdo a Allen et al. (1998).

La ET_o diaria se calculó utilizando la ecuación de Penman-Monteith (Allen et al. 1998). El potencial hídrico de tallo (Ψ_{tallo}) a mediodía (12 h solar) se midió en dos hojas ubicadas en el tercio central del árbol y las cuales están orientadas al sur. Para la medida, las hojas fueron envueltas por pequeñas bolsas de plástico negras, cubiertas con papel de aluminio durante al menos 2 horas antes de las mediciones con la cámara de presión (Soil Moisture Equipment Co., Santa Bárbara, CA, USA., modelo 3005) (Fulton et al. 2001; Shackel K, 2011). Dicha medida se realizó por árbol de cada repetición.



Figuras 2 y 3: Cámara de presión y Porómetro portátil (LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln)

La conductancia foliar (g_{lmd}) y la fotosíntesis neta (F_n) se midieron al mediodía en dos hojas expuestas al sol utilizando un porómetro portátil y cerrado consistente en la medición del intercambio de gases de la fotosíntesis (LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln, NE, EE.UU.). Al igual que en el caso anterior, estas medidas se llevaron a cabo por árbol de cada réplica.

2.3. Zumo de granada

De acuerdo con la demanda del mercado, las granadas comerciales de los tres tratamientos de riego se recolectaron en la fase de maduración de las frutas (14 de octubre, DA 287). Las granadas de cada tratamiento se partieron por la mitad y los jugos se obtuvieron por presión con una prensa del laboratorio (Zumonat C-40, AMD somática, Valencia, España) (Mena et al. 2011). Tras su obtención, los zumos se congelaron a -20 °C hasta el momento del análisis.



Figura 4: Zumo de granada

2.4. Parámetros de calidad en el zumo

Los índices de calidad evaluados en este ensayo fueron: el pH, la acidez valorable (AV) y sólidos solubles totales (SST) (González-Molina et al. 2009). En el caso de la AV y de los SST, los resultados se expresaron como gramos (g) de ácido cítrico por litro, y como °Brix, respectivamente. El índice de madurez (IM), se calculó como la relación entre SST y AV.

2.5. Medida del color

El color del zumo se determinó según Pérez-Vicente et al. (2004). Las muestras se midieron en cubetas de vidrio de 2 mm (CT-A22) a una longitud de la onda de 520 nm utilizando un espectrofotómetro de color triestímulo Minolta CM-508i® (Osaka, Japón) (Figura 5) acoplado a un adaptador de transmitancia CM-A760, con el iluminante D65 y 10° de observador de acuerdo con la convención CIE $L^* a^* b^*$ 76.

Los resultados se expresaron de acuerdo con el sistema CIELAB L^* , a^* , b^* y se calcularon los valores medios de los parámetros de luminosidad (L^*), color rojo-verdoso (a^*) y azul-amarillento (b^*) para cada fruto. El color objetivo se calculó como cromaticidad o croma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) y ángulo hue ($H^\circ = \arctan (b^* / a^*)$).



Figura 5: Colorímetro Minolta CM-508i

2.6. Identificación y cuantificación de componentes fenólicos

Todas las muestras se centrifugaron durante 5 min. a 10.480 x g (Hettich Zentrifugen modelo EBA 21, Tuttlingen, Alemania) a temperatura ambiente. El

sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 μm (MS[®]; Membrane Solutions, Plano, TX, USA.) previamente al análisis en un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) de Merck-Hitachi (Tokio, Japón) (Figura 6), equipado con un detector de diodos UV-vis L-7455, un automuestreador L-7200, una bomba L-7100 y una interfaz D-7000.

Los cromatogramas se registraron y procesaron en un sistema de datos basado en cromatografía Merck-Hitachi D-7000 HSM PC. Las muestras (20 μL) se analizaron en una columna de fase reversa Luna C18 (25 cm x 0.46 cm, con un tamaño de partícula de 5 micras; Phenomenex, Macclesfield, UK) con una precolumna C18-ODS (4,0 x 3,0 mm) (Phenomenex), utilizando una fase móvil de agua / ácido fórmico (95:5, v / v) (disolvente A) y metanol grado para HPLC (disolvente B).

La elución se realizó a una velocidad de flujo de 1 mL / min. El gradiente lineal utilizado para dicha elución comenzó con un 1% de B, manteniendo condiciones isocráticas durante 5 min, alcanzando el 20% de B a los 20 min, 40% de B a los 30 min, 95% de B a los 35 min y el 1% de B tras 41 min. Los cromatogramas UV fueron evaluados a las longitudes de onda de 360 y 520 nm.



Figura 6: Equipo HPLC utilizado en los análisis (Merck-Hitachi)

Para identificar los compuestos anteriormente estudiados se utilizaron patrones analíticos y se evaluaron sus espectros de absorbancia (Pérez-Vicente et al. 2004). Los compuestos encontrados en este estudio se cuantificaron por la absorbancia de sus correspondientes picos.

Las antocianinas fueron cuantificadas como cianidina 3-glucósido (detectado a 520 nm), y ambos isómeros punicalagina y ácido elágico (libre y glucósido) como ácido elágico (a 360 nm).

El contenido de fenoles totales (CFT) se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, adaptado a una microescala por Medina-Remón et al. (2009) con algunas modificaciones. Brevemente, alícuotas de 15 μL de muestra diluida se mezclaron con 170 μL de agua Milli-Q en una microplaca de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), a continuación, se añadieron 12 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 30 μL de carbonato de sodio (200 gL^{-1}). Las mezclas se dejaron reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1h.

Tras el período de reacción, se añadieron 73 μL de agua Milli-Q y se registró la absorbancia a 765 nm en un lector de microplacas Infinite[®] M200 (Tecan, Grödig, Austria) (Figura 7). Las muestras se cuantificaron utilizando

ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro (L^{-1}).



Figura 7: Lector de placas Infinite M200 de la casa comercial Tecan.

2.7. Capacidad antioxidante ABTS⁺

Todas las muestras se centrifugaron a 10.480 x g (Hettich Zentrifugen, Modelo EBA21) durante 5 min. a temperatura ambiente. La actividad de captación de los radicales libres se determinó utilizando el método de radicales libres ABTS⁺ en medio acuoso de acuerdo con Mena et al. (2011). La actividad antioxidante se evaluó mediante la medida de la variación de absorbancia a 414 nm transcurridos 50 min.

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un lector de microplacas Infinite[®] M200 (Tecan) de 96 pocillos (Nunc). Todas las reacciones se iniciaron mediante la adición de alícuotas de 2 μ L de las correspondientes muestras diluidas a los pocillos conteniendo 250 μ L de solución madre. Los resultados se expresaron como mmol L^{-1} de Trolox.

2.8. Diseño y análisis estadístico

El diseño de los experimentos fue completamente aleatorio con cuatro repeticiones, cada repetición constó de tres filas adyacentes de 13 árboles cada una. Las medidas se realizaron en el árbol central de la fila intermedia de cada repetición, que presentó una apariencia (área foliar, sección transversal del tronco, altura, superficie sombreado, etc.) muy similar al resto, mientras que los otros árboles se utilizaron como bordes. Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Una vez realizado el análisis de varianza, se compararon los valores medios con el test de la $LSD_{0.05}$. Los valores de Ψ de tallo, g_l y F_n para cada repetición se promediaron antes de calcular la media y el error estándar (EE) de cada tratamiento.

3. RESULTADOS

3.1 Estado hídrico de la planta

Durante el período experimental, las temperaturas medias diarias de las máximas y mínimas fueron 28,9 y 15,2°C, respectivamente, con una humedad relativa media del 60%. El DPV_{md} osciló entre 0,41 y 2,83 kPa, y la ET_o acumulada fue de 1.037mm (Figura 8). La lluvia total fue muy escasa, alcanzando sólo 60 mm teniendo lugar en 13 episodios diarios (Figura 8).

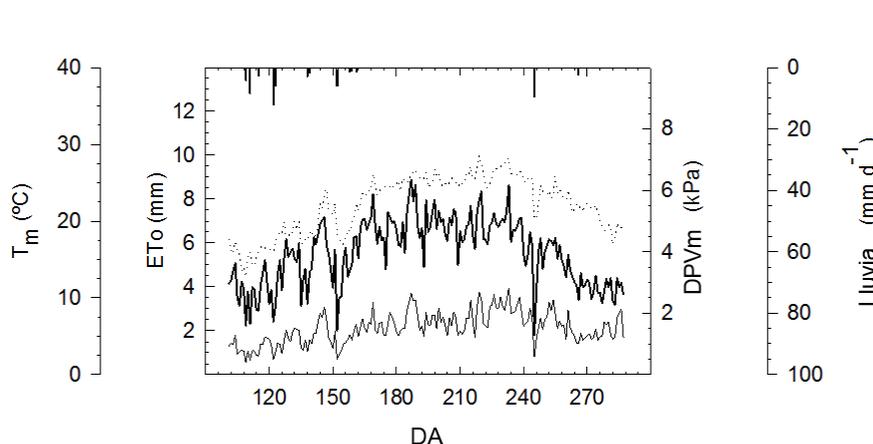


Figura 8. Valores diarios de la evapotranspiración del cultivo de referencia (ET_o , línea gruesa), temperatura media diaria del aire (T_m , línea de puntos), déficit de presión de vapor del aire media diaria (DPV_m , línea delgada) y la precipitación diaria (líneas verticales) durante el período experimental.

Los valores de Ψ_{tallos} para las plantas de los tres tratamientos disminuyeron gradualmente desde el principio del período de medición hasta el día del año (DA) 248 y aumentaron después (Figura 9A). Los valores mínimos de Ψ_{tallos} en el DA 248 fueron -1.23, -1.78 y -2.62 MPa en plantas de los tratamientos T0, T1 y T2, respectivamente. A pesar de la tendencia

moderadamente decreciente observada en los valores de Ψ_{tallo} de plantas del tratamiento T0, estos valores siempre fueron altos, con una media de -0.85 MPa durante el período experimental. Las diferencias de valores de Ψ_{tallo} entre las plantas de los tratamientos T0 y T1 fueron menores que los observados entre las plantas de los T0 y T2 y fueron significativos desde los DA 125 y 154, respectivamente (Figura 9A).

En plantas del tratamiento T0, los valores g_l presentaron una tendencia general a aumentar a medida que avanzaba la temporada (Figura 9B). El riego deficitario sostenido causó una reducción en los valores de g_l en plantas del tratamiento T2 desde el DA 125 en adelante, reflejando un importante grado de regulación estomática durante el período experimental. Sin embargo, el riego deficitario en plantas del tratamiento T1 indujo a que los valores g_l fueran muy similares a los observados en las plantas del T0, excepto en los DA 154 y 248 cuando los valores g_l en las plantas del T1 eran significativamente más bajos que los observados en las plantas del T0 (Figura 9B).

Los valores de F_n en plantas del tratamiento T0 aumentaron desde el comienzo del experimento hasta el DA 154, a partir de ese día variaron ligeramente hasta el DA 248 y desde entonces disminuyeron hasta finalizar el experimento (Figura 9C). Las plantas del tratamiento T1 mostraron valores de F_n muy similares a los observados en plantas del T0, excepto en el DA 248 cuando los valores de F_n en plantas del tratamiento T1 fueron significativamente más bajos que los observados en las plantas control. Por el contrario, el riego deficitario indujo a que los valores de F_n en plantas del tratamiento T2 fueran más bajos que los observados en las plantas de los T0 y T1 desde el DA 125 hasta el final del experimento (Figura 9C).

3.2 Atributos de calidad y parámetros de color

No se observaron efectos significativos como consecuencia del tratamiento de riego sobre los valores de SST, AV y de SST / AV. Por el contrario, el zumo de las granadas del tratamiento T2 mostró un valor de pH inferior a los jugos de otros tratamientos (Tabla 1).

Se observó un efecto significativo del estrés hídrico sobre el color del zumo de granada, (Tabla 2). El zumo de las frutas del T1 mostró valores de a^* y L^* similares al zumo de las del T0. Sin embargo, el zumo del T2 muestra un mayor valor L^* y un menor valor de a^* que el zumo del T0. Por otra parte, el estrés hídrico provocó un aumento progresivo de los valores b^* y H^0 . Además, el valor de C^* en el zumo del T1 fue similar al de los zumos de los T0 y T2, mientras que el valor de C^* en el zumo del T2 fue mayor que en el zumo del T0 (Tabla 2).

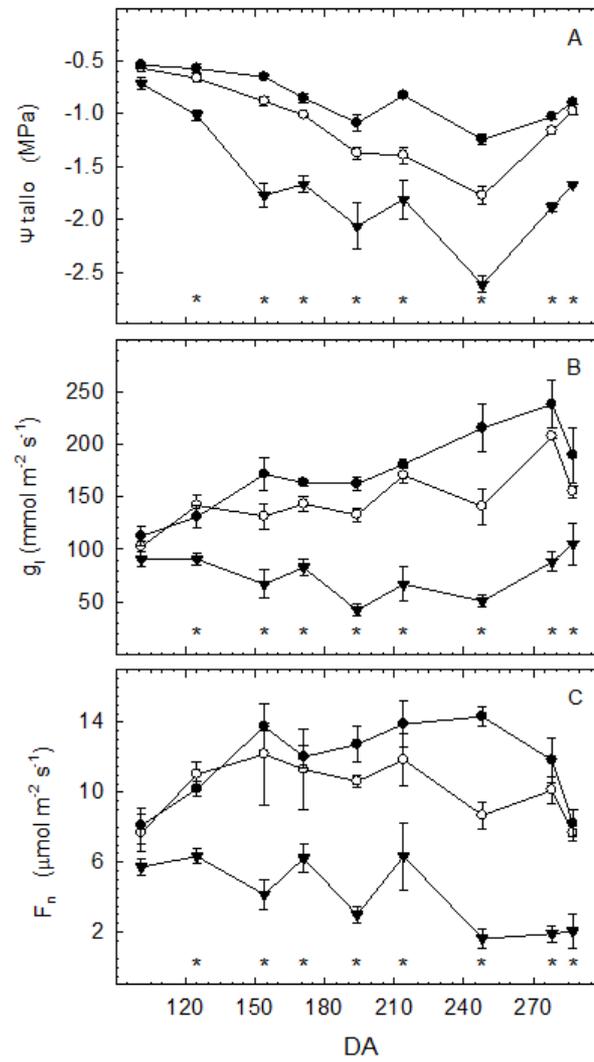


Figura 9. Potencial hídrico del tallo a mediodía (Ψ_{tallo} , A), conductancia foliar a mediodía (g_l , B) y los valores de la fotosíntesis neta (F_n , C) (media \pm EE, no mostrados cuando son menores que los símbolos) para granados del tratamiento T0 (círculos cerrados), T1 (círculos abiertos) y T2 (triángulos) durante el período experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.05$).

Tabla 1. Efecto de los tratamientos de riego en los contenidos de sólidos solubles totales (SST, °Brix), acidez valorable (AV, g L⁻¹ ácido cítrico), pH e índice de madurez (SST/AV) en el zumo de las granadas de cada tratamiento. Valores medios en cada columna de cada tratamiento que tienen letras distintas son significativamente diferentes según el test LSD_{0.05}.

Tratamiento	SST	AV	pH	SST/AV
T0	16,8a	2,5a	4,1a	6,72a
T1	17,5a	2,4a	4,1a	7,29a
T2	17,5a	2,3a	3,8b	7,60a

Tabla 2. Efecto de los tratamientos de riego en los valores de luminosidad (L*), tono rojo-verdoso (a*), tono azul-amarillento (b*), croma (C*) y ángulo hue (H°) en el zumo de granada. Valores medios en cada columna de cada tratamiento que tienen letras distintas son significativamente diferentes según el test LSD_{0.05}.

Tratamiento	L*	a*	b*	C*	H°
T0	9,8b	28,4a	16,7c	33,0b	30,3c
T1	14,1b	27,1a	24,2b	36,5ab	41,6b
T2	23,3a	13,9b	37,6a	40,1a	69,6a

3.3. Compuestos químicos y actividad antioxidante

El tratamiento de riego no afectó al contenido de ácido elágico del zumo de granada (Tabla 3). Sin embargo, los contenidos de antocianinas de los zumos de los tratamientos T0 y T1 fueron similares y mayores que los del zumo del tratamiento T2. El contenido en punicalagina disminuyó a medida que aumentó el estrés hídrico (Tabla 3).

El CFT disminuyó bajo la aplicación de estrés hídrico, encontrándose contenidos similares en los zumos de los tratamientos T1 y T2 (Tabla 3). El estrés hídrico también disminuyó los valores de ABTS⁺, mostrando valores similares en los zumos de los T1 y T2 (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de los tratamientos de riego en el contenido total de antocianinas (CAT, mg L⁻¹), punicalagina (mg L⁻¹), ácido elágico (mg L⁻¹), contenido de compuestos fenólicos totales (CFT, mg GAE L⁻¹) y equivalentes de trolox de la actividad antioxidante (ABTS⁺, mM Trolox). Valores medios en cada columna de cada tratamiento que tienen letras distintas son significativamente diferentes según el test LSD_{0.05}.

Tratamiento	CAT	Punicalagina	Ácido elágico	CFT	ABTS ⁺
T0	70,7a	241,2a	50,0a	3554,9a	42,14a
T1	78,0a	154,3b	41,5a	1938,7b	31,07b
T2	17,6b	65,2c	45,5a	2140,1b	32,49b

4. DISCUSIÓN

El hecho de que las relaciones hídricas de las plantas del tratamiento T0 se caracterizaran por altos valores de Ψ_{tallo} , los cuales sólo disminuyeron ligeramente durante el período experimental, y que el intercambio de gases (g y F_n) aumentaran progresivamente hasta valores muy altos (Fig. 9), sugiere que se alcanzaron los requerimientos hídricos para los granados control. Además, la no aparición de síntomas en las plantas y el hecho de que las relaciones hídricas bajo condiciones de inundación se caracterizan por un comportamiento similar a los observados bajo estrés hídrico, debido a las señales químicas de las raíces y a un aumento en la resistencia a la fluidez del agua a través de la planta (Ortuño et al. 2007; Ruiz-Sánchez et al. 1996), confirman que las plantas control nunca estuvieron inundadas o anegadas.

El rango de desarrollo del estrés hídrico en las plantas de los tratamientos T1 y T2 fue muy bajo, porque los valores de Ψ_{tallo} disminuyeron solamente alrededor de 0.008 y 0.013 MPa día⁻¹, respectivamente (Fig. 9) (Hale et al. 1987). El hecho de que las plantas de los tratamientos T0 y T1 mostraran diferencias mínimas en valores de Ψ_{tallo} y que las diferencias en los valores de intercambio de gases fueran sólo ocasionalmente significativas (Fig. 9) indicó que el riego deficitario sostenido en las plantas del tratamiento T1 indujo un nivel de estrés hídrico moderado. Por el contrario, las diferencias más importantes encontradas en valores de Ψ_{tallo} para las plantas de los tratamientos T0 y T2 y el grado de regulación estomático observado en plantas del T2 (Fig. 9) demostró que el riego deficitario sostenido en estas plantas produjo un nivel de estrés hídrico severo durante el período experimental.

El estrés hídrico no afectó a los parámetros básicos de la calidad del zumo de granada a excepción del pH, donde sólo se encontró una ligera pero significativa reducción como consecuencia de aplicar un estrés hídrico severo (T2) (Tabla 1). Teniendo en cuenta sólo estos parámetros, los zumos de granada de los tratamientos T1 y T2 no reflejan una maduración temprana debida al estrés hídrico alcanzado en el experimento, como cabía esperar debido al efecto de la escasez de agua sobre la calidad morfológica de las granadas (Mellisho et al. 2012).

Los cambios en los valores b^* y H° en el zumo del tratamiento T1, junto con los cambios en todos los parámetros de color en el zumo del T2 indicaron que las granadas sometidas al estrés hídrico moderado (T1) produjeron un zumo más amarillento, mientras que las frutas sometidas al estrés hídrico severo (T2) produjeron un zumo que era completamente distinto y lejos del color real del zumo de granada. Además, el zumo del T2 mostró no sólo un color más amarillento que el zumo del T1, sino también un color rojo menos intenso y con una mayor luminosidad. Estos resultados estaban en concordancia con la disminución en el contenido de antocianinas observado en el zumo de las granadas que sufrieron un estrés hídrico severo (T2) (Tabla 3).

En este sentido, Schwartz et al. (2009) informaron de que las frutas de la granada de zonas desérticas muestran menores niveles de antocianinas totales, tanto en la cáscara como en los arilos en comparación con las frutas cultivadas en condiciones mediterráneas. Gil et al.(1995) expusieron que los frutos orientados directamente a la luz solar acumulaban más antocianinas en la piel que los frutos que se encuentran en las ramas interiores, ya que la luz UV es uno de los factores que afecta a la biosíntesis de las antocianinas.

Por estas razones, y considerando que la temperatura y la incidencia de luz solar son mayores en condiciones desérticas que en condiciones mediterráneas, Schwartz et al. (2009) asumieron que la disminución de los contenidos de antocianinas en la cáscara y en los arilos bajo condiciones desérticas era debido a la temperatura. Teniendo en cuenta que en nuestro experimento los granados de los tres tratamientos de riego estuvieron bajo condiciones climáticas idénticas, así como que la disminución del contenido de antocianinas en el zumo del tratamiento T2 fue debida al riego deficitario (Tabla 3), el estrés hídrico podría ser sugerido como otro factor para controlar la biosíntesis de antocianinas.

El hecho de que el contenido de antocianinas, CFT y la actividad antioxidante disminuyeron en el zumo del tratamiento T2 mientras que sólo disminuyeron el CFT y la actividad antioxidante en el zumo del T1 (Tabla 3) sugiere que compuestos fenólicos distintos a las antocianinas pueden ser los principales contribuyentes de la actividad antioxidante en el zumo de granada. De acuerdo con nuestros resultados, Tzulker et al. (2007) indicaron que las punicalaginas contribuyeron significativamente a la actividad antioxidante en el zumo de granada. Sin embargo, considerando que se observó una disminución en la concentración de punicalagina pero ningún cambio en la concentración de ácido elágico (compuesto de punicalagina hidrolizado (Gil et al. 2000)), esto podría indicar que los niveles de estrés hídrico moderado (T1) y severo (T2) inhiben la biosíntesis de punicalagina.

Es sabido que el estrés hídrico influye en el contenido de metabolitos secundarios de los tejidos vegetales. Sin embargo, los efectos del déficit hídrico sobre la composición fenólica no están claros. De hecho, algunos autores han

sugerido que no es posible establecer una correlación lineal entre el estrés hídrico y los contenidos fenólicos (Gobbo-Neto et al. 2007; Mattson et al. 1987). Por ejemplo, Chaves et al. (2007) reportaron una importante acumulación de antocianinas en uva sometidas a estrés hídrico. Por el contrario, Kennedy et al. (2000 y 2002) mostraron que el estrés osmótico tenía o poco o ningún efecto sobre la acumulación de antocianinas en las de uvas. Esta relación confusa entre el estrés hídrico y la producción fenólica podría atribuirse al hecho de que sólo unos pocos documentos sobre este tema han informado sobre medidas cuantitativas del estrés hídrico, su velocidad de desarrollo y duración, el período fenológico en la aplicación de dicho estrés y otros aspectos esenciales para la caracterización de las condiciones experimentales de estrés hídrico.

Teniendo en cuenta que el crecimiento de la planta comienza a disminuir a un potencial hídrico más alto que en aquella planta en la que el cierre de los estomas se lleva a cabo (Hsiao et al. 1976), Horner (1990) propuso un modelo para predecir la concentración de compuestos fenólicos como una función del estado hídrico de la planta. La relación cuadrática entre las dos variables se basa en la hipótesis de que, bajo un estrés hídrico moderado, la asimilación de CO₂ se podría mantener y los metabolitos secundarios basados en el carbono deberían de aumentar cuando los carbohidratos excedan la cantidad necesaria para el crecimiento de dicha planta. Así, el estrés osmótico moderado podría conducir a una reducción en el crecimiento de las plantas, con el aumento de la concentración de metabolitos secundarios no nitrogenados. Cuando el estrés hídrico aumenta, la regulación estomática tiene lugar y la asimilación de CO₂ se reduce. En esta situación, el carbono debe de asignarse preferentemente a la

síntesis de metabolitos primarios en detrimento de la síntesis de metabolitos secundarios.

5. CONCLUSIONES

De este estudio se han podido sacar dos conclusiones importantes:

- Los zumos procedentes de los granados sometidos a tratamientos de estrés hídrico sostenido, tanto moderado como severo, son de menor calidad y son menos ricos en compuestos bioactivos que aquellos zumos procedentes de granados a los cuales no se les ha aplicado ningún estrés hídrico.
- Desde un punto de vista nutricional, esto significa que una reducción en el riego de este cultivo proporciona una drástica disminución en los niveles de los compuestos fenólicos en los frutos, especialmente en los niveles de antocianinas y punicalaginas, lo que se ve reflejado en el débil color rojo del zumo resultante dando lugar a una menor atracción visual por parte del consumidor.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop evapotranspiration-guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and Drainage 56, Rome.
- Aseri, G.K., Jain, N., Panwar, J., Rao, A.V., Meghwal, P.R., 2008. Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Sci. Hort.* 117, 130–135
- Chaves, M.M., Santos, T.P., Souza, C.R., Ortuño, M.F., Rodrigues, M.L., Lopes, C.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2007. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Ann. Appl. Biol.* 150, 237–252.
- Collins, R., Kristensen, P., Thyssen, N., 2009. Water resources across Europe – confronting water scarcity and drought. EEA Report No. 2/2009, European Environment Agency, Copenhagen.
- El mundo de las plantas, 1999-2014. El cultivo del granado. Disponible en: http://www.botanical-online.com/granado_cultivo.html. Accedido a esta página el 28-03-14.
- Fulton, A., Buchner, R., Olson, B., Schwankl, L., Gilles, C., Bertagna, N., Walton, J., Shackel, K., 2001. Rapid equilibration of leaf and stem water potential under field conditions in almonds, walnuts, and prunes. *Hort. Technology* 11, 609–615.
- Gil, M.I., Cherif, J., Ayed, N., Artés, F. and Tomás-Barberán, F.A., 1995. Influence of cultivar, maturity stage and geographical location on the

- juice pigmentation of Tunisian pomegranates. *Z Lebensm. Unters. Forsch.* 201, 361–364.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4581–4589.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quim. Nova* 30, 374–381.
- González-Molina, E., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2009. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chem.* 115, 1364–1372.
- Guía de consultas diversidad vegetal. FACENA (UNNE). Eudicotiledóneas esenciales-Clado Rosides-Posición incierta-Myrtales: Lythraceae (inc. Punicaceae). Familia Lythraceae (incluyendo Punicaceae). Disponible en: <http://cmapserver.unavarra.es/rid=1JHKZSZHP-CL4TP8-200>.
Accedido a esta página el 28-03-14.
- Hale M.G., Orcutt, D.M., 1987. *The Physiology of Plants under Stress*. Wiley, NewYork, NY.
- Hernández, F., Melgarejo, P., Tomás-Barberán, F.A., Artés, F., 1999. Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *Eur. Food Res. Technol.* 210, 39–42.
- Horner J.D., 1990. Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. *Biochem. Syst. Ecol.* 18, 211–213.

- Hsiao, T.C., Acevedo, E., Fereres, E., Henderson, D.W., 1976. Water stress, growth and osmotic adjustment. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B.* 273, 479–500.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55, 77–85.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 268–274.
- Mattson, W.J., Haack, R.A., 1987. The role of drought stress in provoking outbreaks of phytophagous insects. In *Insect Outbreaks*, ed. by Barbosa P and Schultz JC. Academic Press, San Diego, CA, pp. 365–407.
- Medina-Remón, A., Barrionuevo-González, A., Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Estruch, R., Martínez-González, M.A., Díez-Espino, J., Lamuela-Raventos, R.M., 2009. Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Anal. Chim. Acta* 634, 54–60.
- Mellisho, C.D., Egea, I., Galindo, A., Rodríguez, P., Rodríguez, J., Conejero, W., Romojaro, F., Torrecillas, A. 2012. Pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit response to different deficit irrigation conditions. *Agric. Water Manag.* 114, 30–36.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D.A., Bartual J, Saura D, Martí, N., 2011. Phytochemical characterisation for industrial use of

- pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. J. Sci. Food Agric. 91, 1893–1906.
- Mena, P., Gironés-Vilaplana, A., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2011. Pomegranate fruit for health promotion: myths and realities, in Antioxidant Properties of Crops III, ed. by Jiménez A and García-Viguera C. Functional Plant Science and Biotechnology 5 (Special Issue 2), pp. 33–42.
- Ortuño, M.F., Alarcón, J.J., Nicolás, E. and Torrecillas, A., 2007. Water status indicators of lemon trees in response to flooding and recovery. Biol Plantarum 51, 292–296.
- Pereira, L.S., Cordery, I., Iacovides, I., 2002. Coping with water scarcity. IHPVI Technical Documents in Hydrology 58, UNESCO, Paris.
- Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P., García-Viguera, C., 2004. Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. J. Sci. Food Agric. 84,639–644.
- Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., Artik, N.,2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. J. Food Compo. Anal. 15, 567-575.
- Rodríguez, P., Mellisho, C.D., Conejero, W., Cruz, Z.N., Ortuño, M.F., Galindo, A., Torrecillas, A., 2012. Plant water relations of leaves of pomegranate trees under different irrigation conditions. Environ. Exp. Bot. 77, 19–24.
- Ruiz-Sánchez, M.C., Domingo, R., Morales, D., Torrecillas, A., 1996. Water relations of Fino lemon plants on two rootstocks under flooded conditions. Plant Sci. 120, 119–125.

- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ebadi, A., 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punicagranatum* L.) genotypes. *Sci. Hort.* 111, 24–29.
- Shackel, K., 2011. A plant-based approach to deficit irrigation in trees and vines. *HortScience* 46, 173–177.
- Schwartz, E., Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Yaákov, I., Wiesman, Z., Tripler, E., Bar-Ilan, I. Fromm, H., Borochoy-Neori, H. Holland, D., Amir, R., 2009. Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9197–9209.
- Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M., Amir, R., 2007. Antioxidant activity, lyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9559–9570.