

43TCA. Análisis del comportamiento de semillas de *Citrus limon* L. Burm vc. *eureka* frente a procesos de deshidratación controlada

The desiccation response of *Citrus limon* L. Burm vc. *eureka* seeds using controlled drying conditions

Juliana Marcela Orjuela-Palacio¹, Natalia Graiver¹, M. Victoria Santos^{1,2}, Noemí E. Zaritzky^{1,2}.

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CONICET, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, CIC-PBA, Argentina), Calle 47 y 116 La Plata- Buenos Aires.
2. Depto. de Ingeniería Química- Facultad de Ingeniería (Universidad Nacional de La Plata, Argentina), Calle 1 y 47 La Plata Buenos Aires.

Resumen

La conservación de semillas de cítricos a mediano y largo plazo requiere analizar su tolerancia a la desecación. Se sometieron semillas *Citrus limon* L. Burm vc. *eureka* a 8 condiciones de humedad relativa de equilibrio (HR%) en un rango 11-95% a 20 °C, evaluando el porcentaje de germinación (%G). Se determinó la composición centesimal y la actividad acuosa (a_w) de las semillas. Se evaluó la cinética de desecación a 20 °C; se analizó y modeló la isoterma de sorción mediante las ecuaciones de GAB y D'arcy & Watt. Se aplicó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para identificar las transiciones de fusión de lípidos y de agua en las semillas. La semilla presentó una humedad inicial del 44.67% (b.h) y un contenido lipídico de 22.21% (b.h). El contenido de agua de monocapa de GAB fue 0.080 (g agua/ g b.s.); el modelo de D'arcy & Watt fue el que mejor describió la isoterma de sorción. El %G se cuantificó a los 9, 16, 21 y 25 días y se observó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos utilizando diferentes HR%. Las semillas parcialmente desecadas entre un 11-33 %HR mostraron diferencias significativas con las semillas sin desecar, obteniendo un %G entre 80-83.3%.

Palabras clave: Semillas de cítricos, Desecación, Germinación, isotermas de sorción.

Abstract

The long-term storage of *citrus* germplasm requires analyzing the desiccation tolerance of whole seeds. *Citrus limon* L. Burm vc. *eureka* seeds were desiccated using 8 relative humidities (HR%) until equilibrium conditions were reached (range of 11-95% at 20 °C) and the percentage of germination (% G) was determined for each case. The chemical composition of seeds and water activity were obtained. The moisture sorption isotherm was determined and modeled using the GAB and Darcy & Watt equations and the water content as a function of the desiccation period was evaluated. Differential scanning calorimetry (DSC) was applied to identify the water and lipid melting transitions. The seed presented an initial humidity of 44.67% (w.b.) and a lipid content of 22.21% (w.b.). The GAB monolayer water content was 0.080 (g water / g dry basis); the Darcy & Watt model shows a better fitting of experimental results. The %G was quantified at 9, 16, 21 and 25 days and significant differences were observed between treatments with different HR%. Citrus seeds that were partially desiccated in the range of 11 a 33% HR shows significant differences with seeds without treatment having %G between 80-83.3%.

Keywords: Citrus seeds, desiccation, germination, sorption isotherms.

1. Introducción

Argentina es el octavo productor mundial de cítricos con 2.600.000 toneladas/año, de las cuales el 60%

corresponde a limones (Federación Argentina de Cítricos, www.federcitrus.org), siendo de gran importancia estratégica la conservación de su germoplasma a mediano y largo plazo.

El germoplasma de cítricos ha sido tradicionalmente conservado *ex situ* en viveros y centros de investigación, siendo vulnerables a pestes, enfermedades y desastres naturales (Hong y Ellis, 1995; Lambardi *et al.*, 2004; Graiver *et al.*, 2011). Además, la microflora asociada a las semillas (hongos y bacterias) representa un problema importante en condiciones de almacenamiento de las semillas sin tratamiento (FAO, 2014). Resulta por lo tanto necesaria la conservación de las semillas en bancos de germoplasma, manteniendo la diversidad genética y su disponibilidad para agricultores.

Las semillas pueden ser clasificadas según la tolerancia a la desecación en tres categorías: recalcitrantes, intermedias y ortodoxas. Las semillas ortodoxas pueden ser desecadas hasta contenidos de humedad muy bajos sin sufrir daños; las recalcitrantes que incluyen semillas de frutos tropicales no toleran la desecación por debajo de un contenido de humedad relativamente alto sin causarles daño irreversible. Una tercera categoría de semillas que toleran la desecación entre 10% y 12,5% en base húmeda se denomina intermedia (Farrant *et al.*, 1993, Graiver *et al.*, 2011 Zaritzky, 2015).

Para el género *Citrus* existe una variación considerable en las condiciones de almacenamiento ya que existen especies de semillas que se encuentran en alguna de las tres categorías mencionadas (King y Roberts, 1980; Hong y Ellis, 1995).

Debido a que existen gran cantidad de especies cítricas clasificadas como no-ortodoxas, se requieren técnicas de conservación ya sea a mediano plazo con refrigeración (5 °C) (Villegas-Monter y Andrade-Rodríguez, 2005) o en bancos de criopreservación donde las semillas se someten a una congelación rápida a muy bajas temperaturas (-196 °C), para su conservación a largo plazo (Hor *et al.*, 2005).

El conocimiento de los mecanismos de tolerancia y sensibilidad a la desecación son de gran interés (FAO, 2014) para desarrollar estrategias de conservación. Ya sea que se vaya a conservar a mediano o largo plazo, es importante optimizar el contenido de humedad y las condiciones de germinación (Graiver *et al.*, 2011).

Una conservación inadecuada puede disminuir la viabilidad de las semillas.

El secado excesivo influye sobre la viabilidad de semillas de varias especies cítricas disminuyendo su poder germinativo. Es importante considerar que la pérdida de viabilidad y capacidad de germinación dependen de la especie (Hamilton *et al.*, 2009),

tratamiento de pre-almacenamiento y condiciones de almacenamiento (Villegas-Monter y Andrade-Rodríguez, 2005).

Una de las variedades de limón cultivadas en Argentina es *vc. eureka*. Son plantas vigorosas, con pocas espinas y refrlorescente. Tiene un muy buen rendimiento y su producción se concentra en invierno (alrededor del 70 %) y en verano (un 30 %). Sus frutos tienen buena forma y tamaño, con pocas semillas, buen contenido de jugo y un nivel de acidez adecuado.

Esta variedad se destina al mercado interno y se utiliza principalmente para consumo en fresco, aunque posee buen rendimiento industrial (SINAVIMO, <http://www.sinavimo.gov.ar>; Landa, 2014). La variedad eureka se encuentra en el banco de germoplasma protegido de cítricos y géneros afines del INTA Concordia, Entre Ríos.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la tolerancia a la desecación de las semillas de *Citrus limon* L. Burm *vc. eureka* en condiciones controladas de humedad relativa (HR%), rango del 11 al 85%, evaluando el poder germinativo y las propiedades de sorción para establecer las condiciones óptimas previo a la conservación a mediano o largo plazo. Conocer la respuesta a la desecación de *Citrus limon* L. Burm *vc. eureka* permitirá definir las condiciones adecuadas de almacenamiento en virtud de mantener la viabilidad del germoplasma vegetal.

2. Materiales y métodos

2.1 Semillas

Las semillas se extrajeron manualmente de limones *Citrus limon* L. Burm *vc. eureka*, provistos por la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Concordia, Entre Ríos. La adecuación de las semillas se hizo según el protocolo de De carlo *et al.*, (2011) con modificaciones. Las semillas se sumergieron en etanol (70% v/v) durante 5 minutos, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (2% p/v) durante 15 minutos. Se realizaron 3 lavados con agua destilada y se secaron rápidamente con papel absorbente.

La testa se retiró previo a la etapa de desecación (Figura 1) con el fin de favorecer el proceso de germinación; estudios previos reportaron que la presencia de la testa disminuye el poder germinativo (Cho *et al.*, 2000; Graiver *et al.*, 2011) en otras semillas cítricas

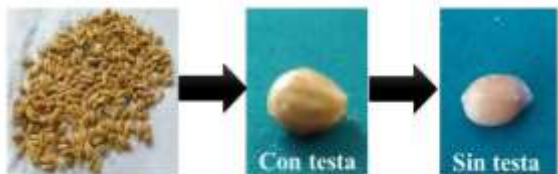


Figura 1. Adecuación de semillas de *Citrus limon L.*
Burm. var. eureka

2.2 Caracterización de las semillas

2.2.1 Composición centesimal

El contenido de humedad se determinó mediante el secado de la muestra en estufa a 105 ± 2 °C hasta alcanzar un peso seco constante (AOAC, 2010). El contenido de proteína total se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC, 2010), utilizando como factor de conversión 6.25.

La determinación del contenido lipídico se realizó por el método de Soxhlet en semillas previamente molidas y secadas en estufa (105 °C), utilizando como solvente éter de petróleo (pe: 40-60 °C). (AOAC, 2010).

El contenido de cenizas se obtuvo mediante la calcinación de las semillas previamente molidas y secas en mufla a 550 °C hasta cenizas blancas (AOAC, 2010). El contenido de carbohidratos se determinó por diferencia.

2.2.2 Actividad acuosa

Para medir la actividad acuosa de las semillas se utilizó un equipo AquaLab Series 4TEV, (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA), calibrado con una solución de LiCl ($a_w = 0.113 \pm 0.002$), NaCl ($a_w = 0.753 \pm 0.002$) a 20 °C. El equipo utiliza la técnica de punto de rocío por condensación sobre un espejo sometido a enfriamiento controlado eléctricamente basado en el efecto Peltier.

2.3 Tolerancia a la desecación

La tolerancia a la desecación de las semillas de limón se estudió mediante curvas de deshidratación a 20 °C. Las semillas se colocaron en recipientes herméticos que contenían soluciones saturadas de sales generando diferentes humedades relativas de equilibrio (HR%). Se utilizaron ocho condiciones de HR% con un total de 50 semillas en cada condición [Cloruro de Litio (LiCl; 11.3%); Cloruro de Calcio (CaCl_2 29.5%); Cloruro de Magnesio (MgCl_2 ; 33%); Nitrito de Magnesio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$; 54.4%); Nitrito de Sodio (NaNO_2 , 64%); Cloruro de Sodio (NaCl; 76%); Cloruro de Potasio (KCl; 85%) y Nitrito de Potasio (KNO_3 ; 95%). Las semillas sometidas a distintas HR se almacenaron en una cámara a 20 °C

y en oscuridad. Se pesaron 10 semillas por condición hasta alcanzar peso constante. El período de desecación fue de 25 días.

2.4 Isotherma de sorción

La isoterma de sorción de las semillas se determinó por el método gravimétrico estático a 20 °C (Rahman y Sablani, 2008; Dussert *et al.*, 2009 Graiver *et al.*, 2011). Los pesos de las muestras se midieron hasta alcanzar un valor constante (diferencia entre 2 pesadas consecutivas $\leq \pm 0.003$ g), donde se asume que se alcanzó el equilibrio; en estas condiciones la actividad acuosa (a_w) de la muestra puede considerarse igual a su correspondiente HR%/100 (Lomauro *et al.*, 1985). Cada punto de la isoterma se realizó por triplicado. El contenido de agua de las semillas en el equilibrio (W_c) se expresó en base seca (b.s). Para cada condición se determinó el contenido de humedad de la semilla en estufa a 105 ± 2 °C hasta alcanzar un peso seco constante (AOAC, 2010).

2.4.1 Modelado matemático de las isothermas de sorción de agua

La relación entre el contenido de humedad de equilibrio (W_c ; g agua/ g b.s) y a_w de las semillas se modeló mediante las ecuaciones de GAB (Guggenheim-Yerson-de Boer) y Darcy & Watt. La ecuación de GAB (ec. 1) se utiliza ampliamente en alimentos (Lomauro *et al.* 1985).

$$W_c = \frac{W_m K C a_w}{(1 - K a_w)[1 - K a_w + C K a_w]} \quad (1)$$

Donde, W_m es la humedad de monocapa (g de agua/ g b.s), C: constante de Guggenheim, característica de la muestra y relacionada al calor de adsorción de la monocapa, K: factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa.

La ecuación de D'arcy & Watt con modificaciones introducidas por Dussert *et al.* (1999) ha sido utilizada para el modelado de isothermas de sorción en semillas (Graiver *et al.*, 2011).

$$W_c = K' + c a_w + \frac{k k' a_w}{1 - k a_w} \quad (2)$$

donde K' describe la sorción de los sitios fuertemente unidos expresado en g de agua/ g b.s; c, k y k' son parámetros específicos del modelo de D'arcy & Watt (Dussert *et al.*, 1999).

Los parámetros se estimaron mediante regresiones no lineales de los datos experimentales con el

programa Origin Pro v 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA USA).

2.4.2 Selección del modelo de isoterma de sorción

Para la seleccionar el modelo que presenta mejor concordancia con los valores experimentales se evaluaron distintos parámetros estadísticos.

Se evaluaron ajustando regresiones lineales para los datos de W_c experimentales vs predichos. Se calculó el porcentaje de variación de la pendiente en el cual se encuentran el 95% de los datos experimentales y se calculó el coeficiente de determinación (R^2).

La bondad del ajuste se determinó mediante el porcentaje de error medio relativo (%E) que expresa la diferencia entre el los datos predichos y experimentales (ec. 3):

$$\%E = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|W_{ci} - W_{cpi}|}{W_{ci}} \quad (3)$$

Dónde “n” es el número de datos experimentales, W_{ci} y W_{cpi} los valores de humedad experimentales y predichos respectivamente. Lomauro *et al.*, (1985) concluyeron que un %E < 10% corresponde a un ajuste del modelo aceptable.

2.5 Análisis del comportamiento térmico por DSC

Se realizó el análisis del comportamiento térmico de la fracción de cotiledón de las semillas equilibradas a 8 humedades relativas y de la semilla control (sin desecación), mediante un equipo de Calorimetría Diferencial de barrido DSC Q-100 controlado por el módulo TA 5000 (TA Instruments; Estados Unidos), con accesorio de calentamiento-enfriamiento con nitrógeno líquido.

Se pesaron entre 7-15 mg de cotiledón en cápsulas de aluminio y se sellaron herméticamente; como referencia se utilizó una cápsula vacía. La velocidad de enfriamiento fue 30 °C/min hasta alcanzar -150 °C con isoterma de 10 minutos; la velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min hasta 50 °C.

Para identificar la transición de fase correspondiente a los lípidos presentes en la semilla, entre 4-10 mg del extracto lipídico fueron analizados por DSC siguiendo el mismo protocolo aplicado a la semilla.

Los termogramas de calentamiento obtenidos se analizaron mediante el software TA Universal

Analysis 2000 (Estados Unidos), para determinar la entalpía en (J/g (b.h)) de la transición de fase y la temperatura de fusión. Después del análisis calorimétrico se perforaron las cápsulas y se secaron a 105±2 °C hasta alcanzar un peso seco constante.

2.6 Ensayos de germinación

La viabilidad de las semillas con y sin desecación previa, se analizó de acuerdo al poder germinativo (% de germinación). Para cada condición de HR% y el control se sembraron 30 semillas distribuidas en 6 cajas de Petri de 90x4.5 mm (5 semillas/caja) que contenían arena húmeda previamente acondicionada según Rao *et al.*, (2006). Se siguió un patrón equidistante cuidando que cada semilla quedara parcialmente cubierta por la arena (Figura 2).



Figura 2. Siembra de semillas en arena

Las cajas tapadas se almacenaron a 25 °C y en oscuridad (Hor *et al.*, 2005; Graiver *et al.*, 2011), realizando riegos periódicos y conteo de las semillas germinadas por día, tomando como criterio de germinación el brote del embrión (>2 mm).

Se calculó el porcentaje de germinación acumulada (%G; ec. 4) y se estudió la cinética de germinación.

$$\%G = \left(\frac{\# \text{ Semillas germinadas}}{\# \text{ Semillas sembradas}} \right) * 100 \quad (4)$$

2.7 Análisis estadístico

Para los resultados de humedad, entalpías y temperaturas por DSC, se aplicó el análisis estadístico de varianza (ANOVA). La comparación de medias se hizo mediante el test de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher usando un nivel de significación $p < 0.05$, con el software SYSTAT v. 12.0 (SYSTAT Inc., USA, 2007).

Las observaciones sobre el número de semillas que germinan siguen una distribución binomial de probabilidad discreta que cuenta el número de éxitos en una secuencia de n ensayos independientes entre sí, con una probabilidad fija p de ocurrencia del éxito entre los ensayos (Kuel, 2001; Warton y Francis, 2011). Un experimento como la

germinación se caracteriza por ser dicotómico, esto es, sólo son posibles dos resultados (germina o no germina). A la germinación se denomina éxito y tiene una probabilidad de ocurrencia p y al otro, fracaso, con una probabilidad $q=1-p$.

Para analizar estadísticamente los resultados de germinación uno de los métodos consiste en previamente transformar los resultados mediante la aplicación de la función arcoseno. Esta transformación genera una distribución normal de los datos y estabiliza las varianzas. Estos son dos supuestos importantes y necesarios para poder utilizar análisis estadísticos como el ANOVA (Warton y Francis, 2011). La transformación de arcoseno ha sido ampliamente aplicada en la transformación de datos de germinación de semillas cítricas (Cho *et al.*, 2002, Walters *et al.*, 2004, Graiver *et al.*, 2011),

La probabilidad binomial estimada es $p=y/n$, donde y es el número de semillas germinadas por caja y n es el número total de semillas sembradas por caja. La variable transformada y' está dada por:

$$y' = \arcsin(p^{1/2}) \quad (5)$$

Debido a que en este trabajo se utilizó $n < 50$ la expresión modificada para calcular y' (Kuel, 2001; Graiver *et al.*, 2011) está dada por:

$$y' = \arcsin\left(\frac{(y+3/8)}{(n+3/4)}\right)^{1/2} \quad (6)$$

Tras la transformación de la variable se realizó el respectivo análisis de varianza y la comparación de medias por la prueba de LSD de Fisher.

Otros autores han aplicado para el análisis estadístico del porcentaje de germinación en semillas de cítricos la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) (Lambardi *et al.*, 2004; Bueno *et al.* 2009, Kaya *et al.*, 2017); dicha prueba es aplicable tanto a variables discretas como continuas y calcula cuán lejos se encuentran los datos observados (O) de los esperados (E) (ec. 7) (McDonald *et al.*, 2009).

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} \quad (7)$$

Para determinar la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en los porcentajes de germinación en función de HR se construyeron las tablas de contingencia de 2x2 con grado de libertad=1, con el software Infostat v. 2016 (Grupo InfoStat, FCA, Argentina).

3. Resultados y Discusión

3.1 Caracterización de las semillas

Las semillas se obtuvieron a partir de limones L. Burm *vc. eureka* con un promedio de 12 ± 7 semillas/fruto, las dimensiones de la semilla sin testa fueron: $L= 8.63 \pm 1.2$ mm; $a= 6.02 \pm 0.8$ mm y $e= 4.24 \pm 0.53$ mm.

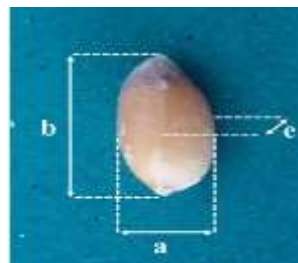


Figura 3. Dimensiones de semilla de limón sin testa.

La composición de la semilla de limón se presenta en la Tabla 1. El valor de a_w inicial fue de 0.961.

Tabla 1. Composición de la semilla de limón sin testa. (b.h = base húmeda).

Contenido	g / 100 g de semilla b.h
Humedad	44.67±4.33
Proteína	12.17±0.41
Lípidos	22.21±0.65
Cenizas	2.04±0.04
Carbohidratos*	18.93

*Valor calculado por diferencia.

3.2 Deseccación de las semillas

El contenido de agua (b.s) en función del tiempo de desecación a diferentes HR% y 20 °C se presenta en la Figura 4.

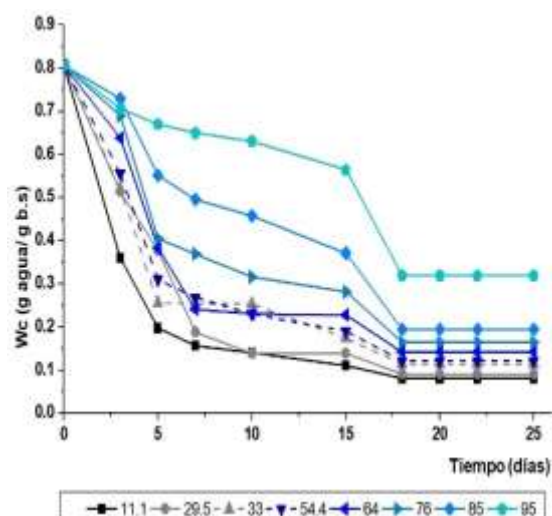


Figura 4. Cinética de secado de semillas para un rango del 11-95% HR.

Durante un periodo de 25 días la disminución en el contenido de agua sigue un comportamiento no lineal decreciente con velocidades que variaron en función de HR%. La velocidad de desecación es un factor importante en la conservación de la viabilidad de las semillas; cuanto más rápido se pueda llevar a cabo la desecación, menor será el contenido de agua al que se pueden secar las semillas antes de que se pierda la viabilidad (Cho *et al.*, 2002).

En el presente trabajo para las semillas *Citrus L. Burm* fue necesario un tiempo mínimo de 18 días para alcanzar el contenido de humedad final de equilibrio, presentando velocidades de secado muy bajas. Dussert *et al.*, (1999) reportaron para semillas de café (intermedias) un tiempo de desecación mínimo de 8 días a 78 HR% y 25 °C.

Al final del periodo de desecación las semillas expuestas a HR% ≤ 54.4 alcanzaron un 0.080 a 0.142 g agua/g b.s y para el rango comprendido entre 64-95% HR un W_c de 0.164 a 0.319 g agua/g b.s.

3.3 Propiedades de sorción

El conocimiento de las propiedades de sorción de agua es de gran interés en la predicción del estado físico del material biológico a diferentes condiciones (Graiver *et al.*, 2011).

Los datos experimentales de sorción de las semillas y las curvas predichas con los modelos de GAB y D'arcy & Watt modificados se presentan en la Figura 5.

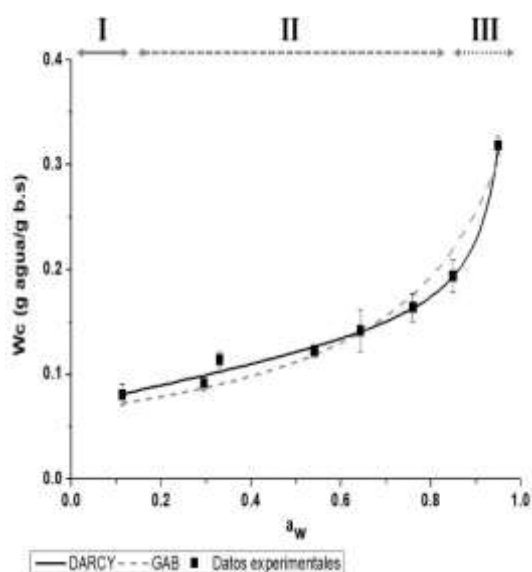


Figura 5. Datos experimentales y curvas de sorción predichas con los modelos de GAB y Darcy & Watt

modificado para semillas *Citrus limon L. Burm vc. eureka* a 20 °C. Regiones (I); (II); (III).

La isoterma presenta la forma esperada para el rango de HR% evaluado, similar al informado por Graiver *et al.*, (2011) para semillas de *C. Paradise*, *C. reticula vc. Criolla* y *vc. Dancy* y *C. sinensis* y *C. aurantifolia*, *C. grandis* y *C. madurensis* por Hor *et al.*, (2005). En la región I de la isoterma de sorción hay poca a casi ninguna actividad fisiológica, las semillas están en un estado inerte (dormancia); en la región II pueden presentarse procesos de envejecimiento de las semillas; en la región III pueden ocurrir procesos metabólicos normales (aunque la germinación no se iniciará a menos del 100% HR) (Gold *et al.*, 2014).

Los parámetros de las regresiones no lineales se presentan en la Tabla 2, junto con las pruebas estadísticas (R^2 ; %E) y la desviación porcentual de la pendiente para los intervalos al 95% de confianza.

La humedad de monocapa de GAB (W_m) fue mucho menor que la reportada para otras especies cítricas; cabe notar que para una HR de 11% la humedad final de la semilla en base seca (W_c) es igual al parámetro de la ecuación de GAB W_m que corresponde al valor de humedad de monocapa (0.08 g de agua/ g b.s)

Tabla 2. Parámetros de regresión y pruebas estadísticas (R^2 ; %E, Desviación) para las isotermas de sorción a 20 °C para semillas de *Citrus limon L. Burm vc. eureka*.

GAB		D'arcy & Watt	
Parámetro	Valores	Parámetro	Valores
W_m	0.080 (0.007)	K'	0.071 (0.0097)
K	0.8253 (0.018)	c	0.082 (0.0336)
C	1.917×10^{45}	k	0.996 (0.0260)
		k'	0.0097 (0.0064)
R^2	0.92	R^2	0.96
E%	11.379	E%	9.685
Desviación	8.92%	Desviación	2.72%

Valores entre paréntesis corresponden al error estándar.

Los parámetros de la ecuación de D'arcy & Watt (K' , c , k y k') fueron similares a los previamente reportados por Hor *et al.*, (2005) para otras semillas cítricas (*C. paradisi* y *C. reticula vc. Criolla*) (Graiver *et al.*, 2011).

Los datos experimentales de W_c versus los resultados predichos de las ec. 1 y 2 se presentan en

la Figura 6.a y 6.b, respectivamente. El modelo de D'arcy & Watt ajusta a la mayoría de los datos (LC= 95%) con una desviación del 2.72% frente a una desviación de 8.92% para el modelo de GAB.

El menor porcentaje de desviación junto con un menor valor de %E y R² mayor (Tabla 2) y un menor error en los parámetros muestran que la ecuación de D'arcy & Watt presenta mejor concordancia para modelar la isoterma de la sorción de semillas de limón.

3.3 Análisis del comportamiento térmico

En la figura 7 se presentan los termogramas de calentamiento para el cotiledón y el extracto lipídico de las semillas de limón.

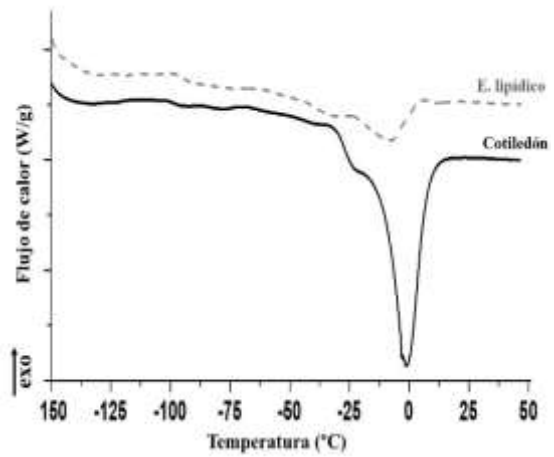


Figura 7. Termograma de calentamiento del cotiledón sin tratamiento de desecación (—) y del extracto lipídico (-----) de la semilla *Citrus limon* L. Burm vc. eureka.

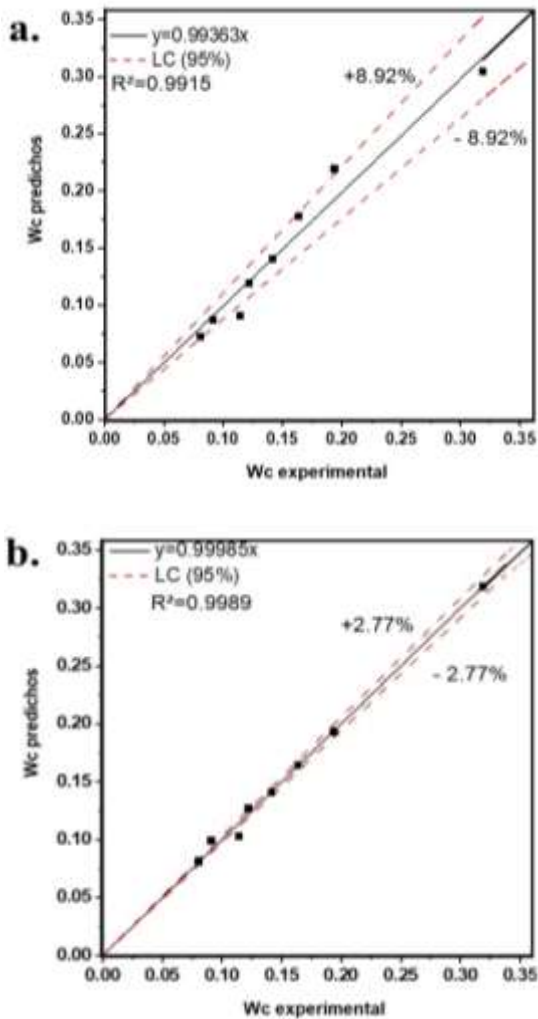


Figura 6. Regresiones lineales de los valores experimentales y los valores predichos con los modelos de GAB (a) y D'arcy & Watt modificado (b) para semillas *Citrus limon* L. Burm vc. eureka.

En la curva correspondiente al cotiledón se observa un pico endotérmico notorio cercano a 0 °C correspondiente a la fusión de agua presente en la semilla ($T_p = -1.07$ °C), el hombro del pico situado a más bajas temperaturas se atribuye a la presencia de lípidos. Hor *et al.*, (2005) reportaron que en el análisis térmico por DSC del extracto lipídico de 4 especies cítricas, se encontró la presencia de transiciones endotérmicas idénticas a las encontradas en los termogramas de semillas con bajo contenido de agua. Hamilton *et al.*, (2009) observaron en cotiledones de semillas de cítricos *C. garrawayi*, *C. australasica*, y *C. indora* (30-54% de lípidos) transiciones de fase correspondiente a la fusión de lípidos (34.8-42.7 J/g lípido b.h) a temperaturas por debajo de la transición de fusión de agua; resultados similares se observaron en semillas de *C. paradise*, *C. reticula* vc. Criolla y vc. Dancy y *C. sinensis* (Graiver *et al.*, 2011).

Para las semillas *Citrus limon* L. Burm vc. eureka con un 22.21% de lípidos se identificó la transición de fusión de los lípidos con un valor de entalpía (ΔH_{lip}) de 10.06 ± 1.1 J/g lípido (b.s), dicha transición se produce en un rango de temperaturas próximo a la fusión del agua (Figura 7).

A medida que se reduce el contenido de agua por desecación a diferentes %HR disminuye el área del pico endotérmico (ΔH_T) y se observa con mayor claridad la superposición de las transiciones de fase de la fracción lipídica y de agua (Figura 8).

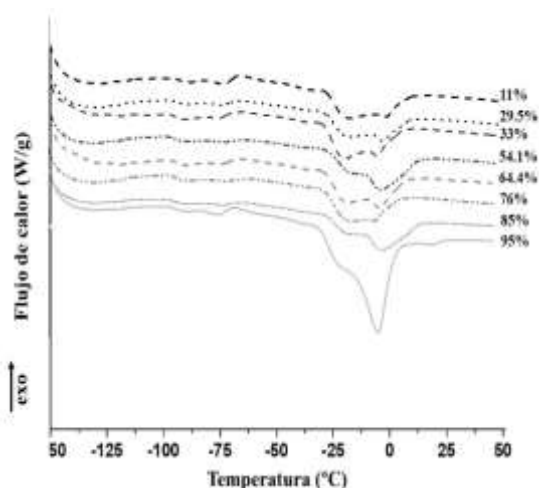


Figura 8. Termograma de calentamiento la semilla *Citrus limon* L. Burm. vc. *eureka* desecadas a diferentes humedades relativas (11 a 95% HR).

A partir de las entalpías de fusión se puede calcular el contenido de agua congelada (X_{fw}) (Ec. 8) y no congelada X_{uw} (Ec. 9) presente en la semilla (Rahman, 2009). El conocimiento de X_{uw} es de gran interés para la criopreservación del germoplasma de la especie cítrica.

$$X_{fw} = \frac{(\Delta H_m)_{semilla}}{(\Delta H_m)_w} \quad (8)$$

$$X_{uw} = X_{wT} - X_{fw} \quad (9)$$

donde $(\Delta H_m)_{semilla}$ es la entalpía de fusión del agua en la semilla (J/ g b.s) y se obtuvo por diferencia entre los valores de entalpía total (ΔH_T) y el valor de la entalpía de la transición de los lípidos (ΔH_{lip}); $(\Delta H_m)_w$ corresponde a la entalpía de fusión del agua pura (333.55 J/ g agua); X_{wT} es el contenido de agua total de la semilla.

La exposición de las semillas a un rango de 11 a 85% HR%, provocó un descenso significativo ($p < 0.05$) en el contenido de agua congelada respecto al control, observándose un corrimiento significativo ($p < 0.05$) de la temperatura de fusión para todas las condiciones.

Después de analizar el proceso de desecación se procedió a estudiar la germinabilidad de las semillas deshidratadas.

3.4 Germinación

Las semillas sin testa y sin desecación previa (Control) alcanzaron el 100% de germinación al día 25 después de la siembra (Figura 9).



Figura 9. Semillas (Control) germinadas a 25 °C en el día 25.

El comportamiento germinativo en un período de 25 días para las semillas desecadas y el control se presenta en la Figura 10.

Todos los tratamientos incluyendo el control requirieron un mínimo de una semana para iniciar la germinación; durante este tiempo las semillas se encontraban en la etapa de dormancia.

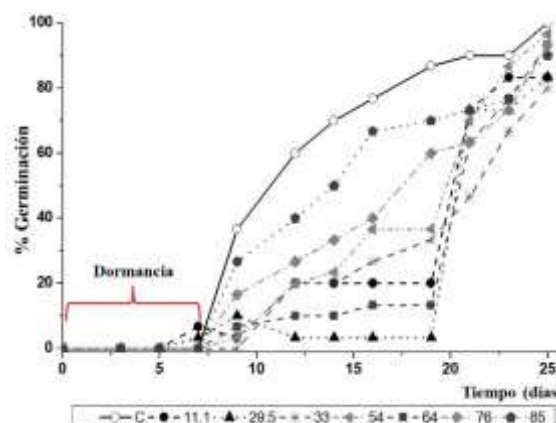


Figura 10. Comportamiento germinativo de las semillas desecadas y el control a 25°C durante 25 días.

Este periodo se extendió por un tiempo mayor para las semillas expuestas a HR% más bajas y cuyas humedades se encontraban entre 9 a 15% (b.h); esto pudo deberse a que la semilla debe rehidratarse para favorecer el proceso de germinación.

El análisis estadístico de los datos de germinación se realizó por la transformación de arcoseno con la comparación de medias por la prueba de LSD de Fisher y la prueba de χ^2 con tablas de contingencia de 2x2.

En la Tabla 3 se presentan los datos de porcentajes de germinación acumulada a 9, 16, 21 y 25 días de siembra para las 8 condiciones de desecación y el control; se presentan las comparaciones por χ^2 aunque ambos métodos arrojaron resultados comparables.

Tabla 3. Porcentaje de germinación acumulada a 9, 16, 21 y 25 días de siembra e índice de germinación de las semillas.

Tratamiento (%Humedad b.h)*	% Germinación acumulada			
	Día 9**	Día 16**	Día 21**	Día 25**
11.1 (9.76 ^a)	6.7 ^{ab}	20.0 ^{abc}	73.3 ^{bc}	83.3 ^{ab}
29.1 (12.11 ^{ab})	10.0 ^{abc}	10.0 ^a	73.3 ^{bc}	83.3 ^{ab}
33 (14.78 ^{bc})	0.0 ^a	26.7 ^{abc}	46.7 ^a	80.0 ^a
54.1 (15.97 ^{cd})	3.3 ^{ab}	36.7 ^c	70.0 ^{ab}	96.7 ^{bc}
65 (18.78 ^{de})	6.7 ^{ab}	13.3 ^{ab}	63.3 ^{ab}	93.3 ^{abc}
76 (21.65 ^e)	16.7 ^{bcd}	40.0 ^c	63.3 ^{ab}	93.3 ^{abc}
85 (25.07 ^f)	26.7 ^{cd}	66.7 ^d	73.3 ^{bc}	90.0 ^{abc}
C (44.67 ^g)	36.7 ^d	76.7 ^d	90.0 ^c	100.0 ^c

*Los valores entre paréntesis corresponden al contenido de humedad de las semillas al momento de la siembra. Diferentes superíndices indican diferencias significativas por columna ($p < 0.05$), calculado con la prueba LSD de Fisher.

**Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos por día (columna) ($p < 0.05$), calculado con la prueba de χ^2 .

Las semillas sin desecación previa presentaron un poder germinativo mayor a partir del día 9, seguido de las semillas expuestas a 76 y 85% HR ($p > 0.05$) (Tabla 3); en el día 16 el control alcanzó el 76.7% de germinación seguido del tratamiento 85% HR ($p > 0.05$).

Las semillas desecadas a 11 y 29% HR no presentaron diferencias significativas con el control y la condición de 85% HR ($p < 0.05$) en el día 21, alcanzando valores superiores al 70% de germinación acumulada; esto indica que las semillas aún estaban en la etapa de dormancia y toleraron la desecación a dichas condiciones.

En el día 25 se observó que las semillas expuestas a $11\% \leq HR \leq 33\%$ presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$) del %G respecto al control con valores de %G= 80-83.3 %. No se observaron diferencias significativas para los porcentajes de germinación de las semillas desecadas a $HR \geq 54\%$ con el control (Tabla 3). Al final del período de germinación todos los tratamientos presentaron porcentajes $\geq 80\%$, límite propuesto por la FAO para considerar pérdida significativa de viabilidad (FAO, 2014), siendo tolerantes a la desecación entre 11 y 85% HR.

Munford y Grout, (1979) reportaron que las semillas *Citrus limon* eran tolerantes a la desecación; Hor *et al.*, (2005) reportaron que las semillas de *C. aurantiifolia* no perdieron viabilidad cuando se desecaron a 8% HR; mientras que Graiver *et al.*, (2011) reportaron porcentajes de germinación menores al 80% para *C. reticula* *vc. criolla* desecadas a 11-43 %HR, *C. reticula* *vc. dancy* a 11% HR, *C. paradisi* entre 11-85% HR y *C. sinensis* en todas las condiciones de desecación, evidenciando que la especie y variedad influyen en la tolerancia a la desecación.

Incluso las condiciones ambientales y geográficas pueden influir sobre la tolerancia a la desecación de diferentes especies cítricas (Hamilton *et al.*, 2009).

En la Figura 11 se presentan los comportamientos típicos de tolerancia a la desecación para semillas (a)

Ortodoxas, (c) Intermedias, (e) Recalcitrantes. Otros dos patrones (b y d) pueden ser encontrados en especies con comportamiento ortodoxo e intermedio (Hong y Ellis, 1996).

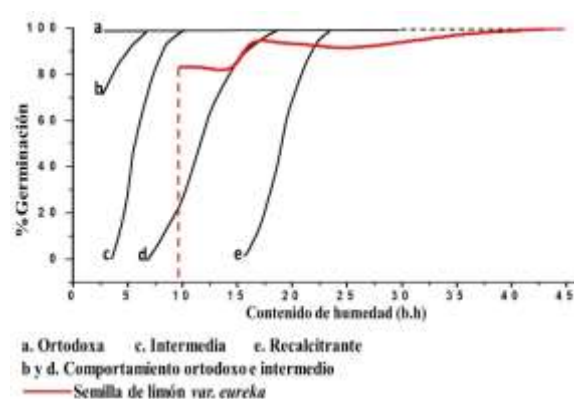


Figura 11. Comportamientos típicos de tolerancia a la desecación para semillas (adaptado de protocolos FAO (2014) con modificaciones).

Para determinar si el comportamiento frente a la desecación es ortodoxo, todas las semillas deben germinar sin presentar pérdida de viabilidad a 5% de humedad (b.h); si la mayoría de las semillas toleran la desecación entre 10 y 12.5% de humedad (b.h), pero una mayor desecación reduce la viabilidad, presentan un comportamiento intermedio. Con un comportamiento recalcitrante, la mayoría de las semillas no son viables por desecación a 15-20% de humedad (b.h) (Hong y Ellis, 1996; Zaritzky, 2015).

En la Figura 11 se superpusieron los porcentajes de germinación obtenidos en el presente trabajo versus el contenido de humedad (b.h) para la semilla *Citrus limon* L. Burm *vc. eureka*. En el rango estudiado de desecación, 11 a 85% HR (9.76 a 25.07% de humedad b.h) se observó que las semillas analizadas presentan un posible comportamiento de semillas intermedias.

Para comprobar y garantizar dicha clasificación resulta necesario evaluar el comportamiento de las semillas a valores inferiores al 5% de humedad (b.h), seguido de un almacenamiento en frío a -20 °C por 3 meses, lo cual se hará en las próximas etapas del trabajo.

4. Conclusiones

Se realizó el análisis del comportamiento de semillas de *Citrus limon* L. Burm *vc. eureka* frente a procesos de deshidratación controlada mediante el estudio de la cinética, propiedades de sorción y el contenido de agua en el equilibrio a 8 condiciones de HR%.

La desecación presentó bajas velocidades, el tiempo de secado si bien se analizó durante 25 días, el período en el cual todas las condiciones han alcanzado el contenido de humedad de equilibrio fue de 18 días.

Las isothermas de sorción de agua se modelaron aplicando 2 modelos (GAB y D'arcy & Watt). El agua de monocapa determinada por GAB fue de 0.08 g de agua/ g b.s. Las pruebas estadísticas y un menor error en los parámetros de regresión, indicaron que la ecuación de D'arcy & Watt presentó mejor concordancia para modelar la isoterma de la sorción.

Mediante el análisis del comportamiento térmico se identificó la transición de fase correspondiente a la fusión de lípidos; dicha transición se superpone con la transición de fusión de agua. Este método permite determinar el contenido de agua congelable de las semillas y su variación frente a los procesos de desecación; el conocimiento de este parámetro es de gran interés para la conservación del germoplasma vegetal en condiciones de criopreservación, ya que la supervivencia dependerá estrictamente de evitar la formación de hielo intracelular.

La transformación de los resultados mediante la aplicación de la función arcoseno y la prueba de χ^2 permitieron realizar el análisis estadístico de los datos de germinación (distribución binomial); ambos métodos arrojaron resultados comparables.

Las semillas presentaron tolerancia a la desecación para las condiciones de HR \geq 54%. Sin embargo hubo diferencias significativas respecto al control en el %G cuando se deshidrataban en un rango de 11 a 33% HR.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración a la Ingeniera Fernanda Rivadeneira de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA en Concordia, Entre Ríos, por proporcionarnos los frutos de limón *Citrus limon* L. Burm *vc. eureka*.

Los autores agradecen a las siguientes instituciones por su apoyo económico y financiero para el desarrollo del presente trabajo: Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-CONICET-CIC-PBA) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT)-ARGENTINA.

5. Referencias

AOAC 2010. *Official methods of analysis*. 13th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. 1018.

Banco de germoplasma protegido de citrus y géneros afines, INTA. Accedido el día 16/11/2017. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-bancogermcitricosprotegido11web.pdf>

Bueno, M., Alzugaray, C., Giubileo, G., Severin, C., & Carnevale, N. (2009). *Evaluación de la calidad*

fisiológica de semillas de Maytenus vitis-idaea cultivadas in vitro. Bosque (Valdivia), 30(3), 146-150.

Cho, E. G., Noor, N. M., Kim, H. H., Rao, V. R., & Engelmann, F. (2002). *Cryopreservation of Citrus aurantifolia seeds and embryonic axes using a desiccation protocol*. CryoLetters, 23(5), 309-316.

De Carlo, A., Lambardi, M., & Ozudogru, E. A. (2011). *Cryogenic technologies for the long-term storage of Citrus germplasm*. *Plant embryo culture: methods and protocols*, 185-200.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. *InfoStat v. 2016*. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Dussert, S., Chabrillange, N., Engelmann, F., & Hamon, S. (1999). *Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus Coffea L.* Seed Science Research, 9(2), 135-144.

FAO. (2014). *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. Edición revisada. Roma.

FAO 2017. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Accedido el día 12/07/2017. <http://www.fao.org/plant-treaty/es/>

Farrant, J. M., Pammenter, N. W., & Berjak, P. (1993). *Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of Avicennia marina and desiccation-tolerant types*. Seed Science Research, 3(1), 1-13.

Federación de cítricos de Argentina. Disponible en: www.fedecitru.org.

Graiver, N., Califano, A., & Zaritzky, N. (2011). *Partial dehydration and cryopreservation of Citrus seeds*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91(14), 2544-2550.

Gold, K., & Hay, F. (2008). *Identifying desiccation sensitive seeds*. Technical Information Sheet, 10.

Gold, K., & Hay, F. (2014). *Equilibrating seeds to specific moisture levels*. Technical Information Sheet 09, Royal Botanic Gardens Kew, UK.

Hong, T.D. & R.H. Ellis. (1996). *A protocol to determine seed storage behaviour*. IPGRI Technical

- Bulletin No. 1. (J.M.M. Engels and J. Toll, vol. eds. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Hamilton, K. N., Ashmore, S. E., & Pritchard, H. W. (2009). *Thermal analysis and cryopreservation of seeds of Australian wild Citrus species (Rutaceae): Citrus australasica, C. inodora and C. garrawayi*. CryoLetters, 30(4), 268-279.
- Hong, T. D., & Ellis, R. H. (1996). *A protocol to determine seed storage behaviour (No. 1)*. Bioversity International.
- Kaya, E., Souza, F., Gökdoğan, E. Y., Ceylan, M., & Jenderek, M. (2017). *Cryopreservation of citrus seed via dehydration followed by immersion in liquid nitrogen*. Turkish Journal of Biology, 41(1), 242-248.
- King, M. W., & Roberts, E. H. (1980). *The desiccation response of seeds of Citrus limon L*. Annals of Botany, 45(4), 489-492.
- Kuehl, R.O. (2001). *Diagnóstico de la concordancia entre los datos y el modelo*. Diseño de experimentos, ed. por Thomson Learning, Inc, Mexico, 123-147.
- Lambardi, M., De Carlo, A., Biricolti, S., Puglia, A. M., Lombardo, G., Siragusa, M., & De Pasquale, F. (2004). *Zygotic and nucellar embryo survival following dehydration/cryopreservation of Citrus intact seeds*. CryoLetters, 25(2), 81-90.
- Landa, R. I. (2014). *Análisis de la producción y comercialización del limón en Argentina*. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Accedido el día 16/11/2017. <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/analisis-produccion-comercializacion-limon.pdf>
- Ledesma, D. A. (1980). *Las muestras de Pearson (Jí cuadrado)*. Estadística médica. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Argentina. 405-459.
- Lomauro, C. J., Bakshi, A. S., & Labuza, T. P. (1985). *Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 18(2), 111-117.
- McDonald, J. H. (2009). *Handbook of biological statistics*. Baltimore, MD: Sparky House Publishing, 2, 173-181
- Rahman, M. S. (2009). *Prediction of ice content in frozen foods*. Food Properties Handbook, segunda ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 193-206.
- Rao, N. K., Hanson, J. E. A. N., Dulloo, M. E., Ghosh, K. A. K. O. L. I., Nowell, D., & Larinde, M. (2006). *Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma*.
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas (SINAVIMO). Accedido el día 16/11/2017. <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/citrus-limon>
- Villegas-Monter, A., & Andrade-Rodríguez, M. (2005). *Secado y almacenamiento de semillas de mandarina 'Cleopatra'*. Pesq. Agropec. Bras, 40(1), 79-86.
- Walters, C., Wheeler, L., & Stanwood, P. C. (2004). *Longevity of cryogenically stored seeds*. Cryobiology, 48(3), 229-244.
- Warton, D. I., & Hui, F. K. (2011). *The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology*. Ecology, 92(1), 3-10.
- Zaritzky, N. E. (2015). *The Role of Water in the Cryopreservation of Seeds*. In Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems. Springer New York, 231-244.