



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTADA DE CIENCIAS AGRARIAS
MAGISTER EN HORTICULTURA

“Determinación de metabólicos asociados a escaldado superficial en peras (*Pyrus communis* L.)”

GLORIA ISABEL SEPÚLVEDA LEÓN

TALCA, CHILE
2019



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
MAGISTER EN HORTICULTURA

“Determinación de metabólicos asociados a escaldado superficial en peras (*Pyrus communis* L.)”

GLORIA ISABEL SEPÚLVEDA LEÓN

Presentada a la Universidad de Talca
como parte de los requisitos para optar al grado académico de

MAGÍSTER EN HORTICULTURA

TALCA, CHILE
2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

Profesor guía

Dr. Carolina Andrea Torres Del Campo, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca.

Profesor informante

Dr. Bruno Defilippi Bruzzone, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Chile.

Comisión evaluadora

Dr. Carolina Torres del Campo, Universidad de Talca

Dr. Bruno Defilippi, INIA-INIA

Dr. Alejandra Moya León, Universidad de Talca

La presente tesis de Grado fue financiada por la Comisión Nacional de Investigación
Ciencia y Tecnología (CONICYT), mediante el programa FONDECYT Regular
N°1161579 y FONDEQUIP N°EQM 120191

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Introducción general	1
Escaldado superficial en peras (<i>Pyrus communis</i>L.)	3
Antecedentes generales.....	3
Etiología.....	3
Factores predisponentes.....	5
Rol de los antioxidantes en el desarrollo de ES.....	6
Rol de la madurez y etileno sobre el desarrollo de ES.....	8
Biomarcadores de ES.....	8
Determinación de metabolitos asociados a escaldado superficial durante la post cosecha de peras provenientes de diferentes zonas climáticas, estados de madurez y tratamientos de post cosecha (DPA y 1-MCP)	11
Resumen.....	11
Introducción.....	13
Materiales y métodos.....	15
Resultados y discusión.....	22
Conclusión.....	42
Literatura citada	43
Anexo	53

RESUMEN

El escaldado superficial (ES) es un importante desorden fisiológico en peras (*Pyrus communis* L.). La etiología del ES ha sido ampliamente investigada en manzanas, pero escasamente en peras. Bioquímicamente, los compuestos 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO), 6-metil-5-hepten-2-ol (MHOL), antioxidantes del tipo fenólicos y algunos fitoesteroles han sido relacionados a ES en manzanas, pero no en peras. El objetivo de este estudio fue identificar metabolitos (volátiles, semi-polares y no polares) asociados a ES como futuros predictores de ES en peras cv. Packham's Triumph.

El experimento fue realizado durante la temporada 2016/17 en peras cv. Packham's Triumph con diferentes estados de madurez, cosechadas desde diferentes zonas productivas. La fruta fue almacenada en frío convencional (FC; -1°C, >90% HR) por 210 días, más 14 días a temperatura ambiente (20°C) para determinar la incidencia de ES. De las peras se extrajo la piel a cosecha y de diferentes momentos durante la guarda (15, 45, 180 y 210 días) las que fueron congeladas a -80°C. Posteriormente, fueron extraídos los compuestos volátiles, semi-polares y no polares y luego cuantificados mediante el uso de cromatografía gaseosa (GC-MS) y líquida (uHPLC-MS), respectivamente. Análisis multivariados (PCA, PLS-DA) fueron utilizados para identificar metabolitos asociados a diferentes niveles de incidencia de ES (0=sin a 4=>50% incidencia). Durante los primeros 45 días de guarda los trienoles Tc258 y Tc269 fueron significativamente asociados al ES en las categorías de mayor incidencia (3-4) expresado a los 180 y 210 días de guarda más 14 días a temperatura ambiente. Posteriormente a los 180 y 210 días de guarda la epicatequina fue encontrada en mayor concentración en fruta sin incidencia de ES, mientras que los trienoles Tc 258 y Tc69, MHO y la procianidina A2 fueron encontrados en mayor proporción en fruta con ES. Durante el desarrollo del escaldado superficial en peras, estarían participando procesos oxidativos no enzimáticos durante la etapa de almacenaje en frío de la fruta y paralelamente antioxidantes del grupo de las catequinas estarían relacionadas inversamente con la expresión de ES, sin embargo, estas al final del almacenaje, durante la exposición a temperatura ambiente de la fruta, estarían participando en procesos de polimerización.

Palabras Claves: Escaldado superficial, peras, metabolitos.

ABSTRACT

Superficial scald (SS) is an important physiological disorder in pears (*Pyrus communis* L.). The etiology of ES has been widely researched in apples, but poorly in pears. Biochemically, the compounds 6-methyl-5-hepten-2-one (MHO), 6-methyl-5-hepten-2-ol (MHOL), phenolic antioxidants and some phytosterols have been related to ES in apples, but not in pears. The aim of this study was to identify metabolites (volatile, semi-polar and non-polar) associated with SS in order to identify potential predictors of SS on winter pears. The experiment was carried out during the 2016/17 season in pears cv. Packham's Triumph with different maturity stages, harvested from different growing conditions. The fruit was then stored in refrigerated rooms with regular atmosphere (RA; -1°C, >90% Relative humidity) for 210 days. Superficial Scald assessment was conducted after 180 and 210 days into storage plus 14 days at room temperature (20°C). Fruit skin was sampled at different harvest and storage (15, 45, 180, and 210 days) times, and stored at -80°C. Subsequently, the volatile, semi-polar and non-polar compounds were extracted and quantified using gas and liquid chromatography (GC-MS; uHPLC-MS).

Multivariate analyses (PCA, PLS-DA) were used to identify metabolites associated with different levels of SS incidence (0= non damage to 4=>50% incidence). During the first 45 days of storage, trienols Tc258 and Tc269 were significantly associated with SS in categories of highest incidence (3-4) after 180 and 210 days of storage. At both time-points epicatechin was found in higher concentration in fruit without SS, while Tc258 and Tc269, MHO and procyanidin-A2 were found in a higher amount in fruit with SS. On the other hand, catechins appear to be inversely related to the expression of SS. However, these last parts of the storage, during exposure to the ambient temperature of the fruit, will participate in the polymerization processes.

Keywords: Superficial scald, pears, metabolite.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las peras (*Pyrus communis* L.) cv. Packham's Triumph ocupan 435,2 ha en Chile, la segunda en importancia antecedida por Abate Fetel con 990,4 ha., con un total plantado de 9.000 ha. en Chile (ODEPA, 2018). La pera ocupa el cuarto lugar de exportación, con 130.000 ton en la temporada 2016/17 (ODEPA, 2018) y entre los cultivares, Packham's Triumph ocupa el primer lugar en volumen con 48.535 tons., seguida de Abate Fetel con 36.399 ton durante la temporada 2016/17 (ASOEX, 2017).

Los principales destinos de las peras chilenas son Rusia (13%), Holanda (10,4%), Italia (10,1), Alemania (8%) y EE.UU. (7,6%) (ODEPA, 2018), la distancia de estos mercados obliga a Chile a almacenar la fruta por un periodo en frío, en el cual se desencadenan desordenes como "bitter pit", escaldado superficial (ES), pudriciones, etc. (Alvear, 2003).

El escaldado superficial es el principal desorden fisiológico en peras y manzanas, originado por el estrés oxidativo, debido al extenso tiempo de exposición de la fruta al frío (Ingle y D'Souza, 1989). Los síntomas son manchas pardas sólo en la piel de la fruta (Anet, 1972). Las condiciones de huerto, clima (Thomai *et al.*, 1998) y susceptibilidad varietal inciden la manifestación de ES, y de igual modo, el estado de madurez fisiológico del fruto a cosecha donde frutos más inmaduros expresan mayor incidencia de ES (Ingle y D'Souza, 1989). En peras, Zoffoli *et al.* (1998) encontró una relación de ES con estados inmaduros en peras cv. Bartlett, luego Moggia *et al.* (2002) no encontró una relación de ES con el estado de madurez en peras cv. Packhams Triumph y finalmente la incidencia de ES fue relacionada con estados de avanzada madurez en peras cv. Packhams Triumph (Calvo *et al.*, 2015). Dado lo anterior, existe información poco consistente respecto del estado de madurez sobre la incidencia de ES en peras, donde solo se conoce la susceptibilidad varietal. Debido a que no existe consistencia del efecto de la madurez y huerto sobre la incidencia de ES en peras, se propone el estudio de los metabolitos asociados directa e indirectamente (antioxidantes, fitoesteroles y volátiles) a ES en post cosecha con el fin de identificar biomarcadores que permitan predecir su aparición temprano en la guarda.

Literatura citada

- Alvear, F., 2003. Efectividad de una doble aplicación de DPA en el control de escaldado de manzanas cv. Granny Smith y su relación con los compuestos α -farneseno y trienos conjugados. Memoria de título. Universidad de Talca. Chile.
- Anet E., 1972. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. VIII. Volatile products from the antioxidation of Alpha-farnesene. *J. Sci. Food Agric.* 23: 605-608.
- ASOEX, 2018. Export data year book, 2017. Digital book of Chilean Fresh Fruit Exporters Association.
- Calvo G., Candan A.P., Civello, M., Giné-Bordonaba J. y C. Larrigaudière, 2015. An insight into the role of fruit maturity at harvest on superficial scald development in 'Beurréd'Anjou' pear. *Sci. Hortic.* 192: 173–179.
- Ingle, M. y M. D'Souza, 1989. Physiology and control of superficial scald of apples: A review. *HortScience*, 24: 28-31.
- Moggia, C. 2002. Escaldado en manzanas. Centro de Pomáceas. Boletín técnico, 2, 1-4.
- Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). 2018. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. (en línea). Recuperado de <http://www.odepa.gob.cl>. Consultado: 26febrero de 2019.
- Thomai T., Sfakiotakis E., Diamantidis G. y M. Vasilakakis, 1998. Effects of low preharvest temperature on scald susceptibility and biochemical changes in 'Granny Smith' apple peel. A review. *Scientia Horticulturae.* 76: 1-15.
- Zoffoli P., Richardson D., Chen P. y D. Sugar, 1998. Spectrophotometric characterization of superficial and senescent scald in pear fruits relative to different stages of maturity. *Acta Hort.* 475. ISHS: 543-558.

ESCALDADO EN PERAS (*Pyrus communis* L.)

SUPERFICIAL SCALD IN PEAR (*Pyrus communis* L.)

Antecedentes generales

El escaldado superficial (ES) es el desorden fisiológico más importante económicamente en países productores de manzanas y peras (Calvo y Colodner, 2014). Este es un desorden fisiológico de post cosecha que afecta la calidad de manzanas (*Malus domestica* Borkh), peras europeas (*Pyrus communis* L.) y peras asiáticas (*Pyrus serotina*) (Soria y Recasens, 1997). A nivel mundial se producen 22.516 mil ton de peras siendo China el principal productor y exportador con 16.140 mil toneladas producidas, seguido por la Unión Europea con 2.386 mil ton. Chile ocupa el noveno lugar en esta categoría con 262 mil toneladas producidas (World Fresh Pear Forecast, 2017). La exportación de peras es nuevamente liderada por China con 543 mil toneladas, ocupando Chile el quinto lugar con 130 mil toneladas en la temporada 2016/2017 (World Fresh Pear Forecast, 2017; Foreign Agricultural Service, 2018). Del total de la producción mundial, el 10% de la fruta es destinado a procesos agroindustriales, mientras que Chile destina un 24% a agroindustria (Foreign Agricultural service, 2018).

Etiología

El escaldado superficial es el principal desorden fisiológico en peras y manzanas, originado por el estrés oxidativo debido al extenso tiempo de exposición de la fruta al frío (Ingle y D'Souza, 1989). El desorden se manifiesta en fruta almacenada por largos periodos a bajas temperaturas (más de 2 meses a 1-4°C) (Watkins, 1993). Los síntomas son manchas superficiales de color pardo en la piel de los frutos, abarcando de cuatro a cinco capas de células hipodermales (Watkins *et al.*, 1995). En peras la dinámica de aparición de los síntomas varían dependiendo del cultivar en Bartlett las manchas aparecen primero alrededor del cáliz en la zona distal del fruto, y en peras cvs. D'Anjou y Packham's los síntomas aparecen en la zona proximal o pedicelar fruto (Zoffoli *et al.*, 1998). Las manchas sólo aparecen después de un período de 7 a 14 días a temperatura ambiente (20°C) una vez finalizado el almacenamiento. El ES se desencadena de la oxidación del α -farneseno (2,6-dimetil-10 metilen- 2,6, 11-dodecatrieno) (Anet, 1972) a compuestos volátiles sesquiterpenos presentes en la cutícula de la piel de los frutos causando el pardeamiento típico del desorden (Lurie y Watkins, 2012). El α -farneseno se acumula en la piel del fruto durante la madurez alcanzando su concentración más alta a las 12 semanas de guarda (Barden y Bramlage, 1994) en manzanas (Chen

et al., 1990; Isidoro y Almeyda, 2006; Whitaker *et al.*, 2009) y después de las 16 semanas en peras (Calvo *et al.*, 2015). Durante el almacenaje se incrementa la producción de etileno y también la expresión del gen de la α -farneseno sintasa, enzima responsable de la biosíntesis de α -farneseno a partir de geranyl difosfato y isopentenil difosfato (Rupasinghe *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2007), aproximadamente 4 semanas antes de aparecer el metabolito (Pechous *et al.*, 2005).

Algunos de los productos de la oxidación del α -farneseno son los trienoles conjugados (Tc, hidroperóxidos o endoperóxidos de farnesil) abundantes en las absorbancias a 258, 269 y 281 nm de longitud. Estos trienoles se expresan como Tc258, Tc 269 y Tc281, los que finalmente derivan, producto de continuas oxidaciones, a compuestos volátiles como acetaldehído, formaldehído, acetonas, metil etil acetona, piruvaldehído, 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO) y 6-metil-5-hepten-2-ol (MHOL). Sólo MHO ha sido correlacionado positivamente con la incidencia de ES (Anet, 1972; Mir *et al.*, 1999; Rudell *et al.*, 2009), sin embargo, se han encontrados niveles muy bajos en la piel de manzanas Granny Smith y muy altos en Cortland, ambos cultivares con altas incidencias de escaldado (Mir *et al.*, 1999). Por otro lado, los trienoles se acumulan posterior a la síntesis de α -farneseno y no siempre sus concentraciones se correlacionan con ES en manzanas (Whitaker *et al.*, 2000).

En peras se han detectado α -farneseno en niveles similares a manzanas, mientras que los trienoles y MHO en bajas concentraciones en la piel de la fruta (Larrigaudiere *et al.*, 2004; Hui *et al.*, 2016). Por lo tanto, no solo MHO sería el responsable del pardeamiento, , continuas oxidaciones de los trienoles, podrían afectar los lípidos de membranas de las células de la epidermis, provocando la ruptura de las células epidérmicas, la oxidación de fenoles y el pardeamiento característico de ES (Lurie y Watkins, 2012). Durante este proceso oxidativo, las fruta podría inducir resistencias, entre las cuales la síntesis y acumulación de antioxidantes en los tejidos epidérmicos a cosecha y durante el almacenaje podrían estar reduciendo la susceptibilidad de la fruta a manifestar ES (Huelin, 1964; Calvo *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016), así como también, la composición de los fitoesteroles en la membrana celular), los cuales podrían estar participando de los procesos oxidativos (Rudell *et al.*, 2009), afectando la estabilidad de la membrana, siendo la causa probable de la muerte celular durante la manifestación de ES (Croteau *et al.*, 2002).

Factores predisponentes

Zonas productivas

La mayoría de los estudios en relación al efecto de zonas agroclimáticas sobre la incidencia de ES han sido realizados en manzana. El clima ha demostrado tener una clara influencia sobre la susceptibilidad al ES en manzanas, debido a la acción conjunta de diversos parámetros como la temperatura, la humedad relativa y la radiación. En zonas de clima seco el riesgo de escaldado es mayor que en climas húmedos (Durán, 1983). Barden y Bramlage (1994) observaron que reduciendo la intensidad de luz disminuye la concentración de antioxidantes en la piel y aumenta la susceptibilidad al escaldado. Merritt *et al.* (1961) fueron los primeros en evidenciar una menor incidencia a ES cuando manzanas cv. Stayman se sometían a temperaturas inferiores a 10°C antes de cosecha. El acondicionando de la fruta a baja temperatura en huerto mejoraba la tolerancia al frío, incrementando los antioxidantes y fosfolípidos insaturados, provocado por una aclimatación de la fruta al frío y generando un mecanismo de protección para ES (Diamantidis *et al.*, 2002). En el año 1989, Bramlage y Meir propusieron determinar la susceptibilidad de las manzanas a ES en base a las temperaturas inferiores a 10°C antes de cosecha en 9 cultivares de manzanas, siendo consistente sólo en Cortland en 3 temporadas. Un modelo similar, basado en temperaturas inferiores a 10°C acumuladas 42 días antes de cosecha, fue desarrollado para manzanas cv. Staking Delicious por Thomai *et al.* (1998) y validada por otros investigadores (Little y Taylor, 1981; Barden y Bramlage, 1994; Diamantidis *et al.*, 2002), sin embargo pruebas del efecto de temperaturas a 10°C en peras no han sido significativamente relacionadas a ES en peras.

Susceptibilidad varietal

Las variedades de peras más susceptibles son Packham's Triumph, Beurré D'Anjou, Bartlett, Rocha y Comice, entre otras, mientras que la variedad Williams y las bicolors son menos susceptibles (Chen *et al.* 1990; Little y Holmes, 2000; Isidoro y Almeyda *et al.* 2006; Whitaker *et al.* 2009). Peras Bartlett producidas en California fueron más susceptibles a ES, con una rápida acumulación de α -farneseno y trienoles, temprana producción de etileno en las dos temporadas de estudio (2006-07) y una mayor incidencia de escaldado respecto a la fruta producida en Washington (Whitaker *et al.*, 2009). Sin embargo, este último estudio no consideró variables ambientales, sólo considerando el avance en estado de madurez a través de la firmeza, etileno y tasa respiratoria. Estudios señalan que las diferencias en susceptibilidad al escaldado entre cultivares podría estar determinado por diferencias en la concentración de antioxidantes naturales en la piel del fruto (Meir y Bramlage, 1988; Barden y Bramlage, 1994; Calvo *et al.*, 2015).

Rol de los antioxidantes sobre el desarrollo de ES

Los antioxidantes más abundantes en la piel de los frutos son los polifenoles, estructuras que se caracterizan por poseer uno o más anillos fenólicos. Estos polifenoles se pueden clasificar dependiendo de los anillos fenólicos que tengan o de elementos estructurales que posean estos anillos en ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones *et al.*, 2012). Estos compuestos tienen como función biológica la defensa contra la radiación UV y la defensa contra patógenos (Ferretti *et al.*, 2010). Los polifenoles presentes en las plantas son antioxidantes importantes debido a sus elevados potenciales redox, los cuales les permiten actuar como agentes reductores frente a radicales libres que se encuentren en el medio (Tsao y Yang, 2003). Los radicales libres son moléculas que contienen en su órbita externa uno o más electrones no apareados, los cuales pueden reaccionar con otras moléculas del medio (Andresen *et al.*, 2006).

Un gran número de antioxidantes se encuentran en las manzanas, constituidos por ácidos hidrocínámicos, flavan-3-oles o procianidinas, antocianinas, flavonoles y dihidroxi-chalconas. En peras las cantidades de antioxidantes son menores respecto a las manzanas, encontrándose ácidos fenólicos, flavonoles, flavan-3-oles y antocianinas (Kevers *et al.*, 2011). Los principales constituyentes de la piel de las peras son arbutín, ácido clorogénico, catequinas y proantocianidinas (Ranadive y Haard, 1971; Galvis *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2013). En general, en peras se han identificados en cutícula de 16 tipos de peras (*Pyrus spp.*) 34 flavonoides y 19 ácidos hidroxycinamatos. Ambos cultivares, D'Anjou y Packham's presentaron significativamente mayor cantidad de isorhamnetina-glucosidas y malonatos, y en menor cantidad quercetina glucosilada (Schieber *et al.*, 2001; Lin y Harnly 2008). El mayor constituyente antioxidante, en todos los cv. de peras, el ácido clorogénico (ácido hidrocínámico) es el de mayor proporción en el cv. D'Anjou. La epicatequina fue el flavan-3-ol más abundante en la piel, en mayor proporción en peras Packham's y en mínimas proporciones de D'Anjou (Galvis *et al.*, 2003). Los flavonoles en Packham's están en mayor proporción que en el cultivar D'Anjou. Packham's presentó mayores niveles de isorhamnetin-rhamnosido-glucosido y isorhamnetina-glucosido (10,3mg/100g peso fresco), mientras que D'Anjou presentó mayores niveles de Quercetina-3-O-rutinosido (5,5 mg/100 g peso fresco) (Galvis *et al.*, 2003). Arbutina es un flavonoide abundante en D'anjou más que en Packham's con niveles de 81,7 y 72 mg/100g de peso fresco en piel respectivamente (Galvis *et al.*, 2003).

Con respecto a los niveles de ácido ascórbico y ácido dehidro-ascórbico en peras, ambos fueron detectados en la piel y sólo deshidro-ascórbico en la pulpa de seis cultivares de peras (Coscia, Red D'Anjou, D'Anjou, Bosc, Packhams y Forelle). Packhams y D'Anjou presentaron similares niveles

de ácido ascórbico, con 3,9 - 4,0 mg/100g de peso fresco respectivamente. Al comparar el aporte de ácido ascórbico a la capacidad antioxidante, en Packham's, el ácido ascórbico aportó sólo un 18% a la capacidad antioxidante, mientras que los fenoles aportan un 71%. En peras D'anjou el ácido ascórbico aportó un 13% y los fenoles 71% a la capacidad antioxidante total (Galvis *et al.*, 2003). Al comparar los niveles de fenoles, ácido ascórbico y capacidad antioxidante (ORAC) en 14 cvs. de manzanas y 6 cultivares de peras en dos temporadas, 3 cosechas y 3 tipos de almacenaje, se encontró que después de 1 semana de almacenaje el ácido ascórbico su contenido se redujo en un 75%, mientras que los fenoles y la capacidad antioxidante se reducen en un 25% en la piel de la fruta. Entre las temporadas, la variación de estos compuestos es significativa, pero no así entre estados de madurez a cosecha (Kevers *et al.*, 2011). Además, al comparar tecnologías de post cosecha (atmósfera controlada a 1°C y 1.5% O₂; 2.0% CO₂, y ultra bajo oxígeno, 1°C, 0.9% O₂ y 1.2% CO₂, ULO), en donde a los 3 meses de guarda la condición de ULO elevó los fenoles en un 50% (de 200mgCAE/100g peso fresco a 350mgCAE/100g peso fresco) para luego disminuir, mientras que el otro tratamientos siempre disminuyeron los fenoles en manzanas King Jonagold (Kevers *et al.*, 2011).

Del total de antioxidantes, hay un grupo de compuestos asociados a pardeamiento en vegetales. Mathew y Parpia, (1971) reportaron a catequina, quercetinas en mayor proporción y en menor medida miricetina y kaempferol, los cuales en pequeñas o grandes cantidades eran capaces de manifestar pardeamiento en plantas. En el pardeamiento enzimático en frutos, Mathew y Parpia (1971) encontró que las catequinas son buenos sustratos para enzimas polifenoloxidasas. Para (+) - Catequina, (-) epicatequina, y (-) epigallocatequina, el galato fue efectivamente oxidado por las enzimas del té (Takeo, 1965). Entre las catequinas, las epicatequinas y las epigallocatequinas, las catequinas fueron más fácilmente oxidadas que el resto (Netjei y Koeppan, 1961). Estudios de pardeamiento, mostró que las quercetinas glucosiladas y la mitritrina no se oxidaron por las polifenol oxidasas (Roberts y Wood, 1951). Miricetina y butina, sin embargo, se oxidaron a la mitad de la velocidad que la catequina. Baruah y Swain (1959) demostraron que si bien la polifenolesa de papa catalizó la oxidación de quercetina, miricetin y luteolina, fue incapaz de oxidar el 3-glucósido de quercetina y miricetina, dado esto, Roberts y Wood (1960) propuso que la estructura plana de las moléculas puede ser uno de los factores que determina la capacidad de un flavonoide para funcionar como sustrato para polifenoloxidasas de plantas.

Rol del estado de madurez y etileno sobre el desarrollo de ES

Se ha demostrado que la susceptibilidad a ES en variedades de manzana está influenciada por la madurez a cosecha (Dilley, 1993; Girard y Lau, 1993; Patterson, 1993). Estudios señalan que en la manifestación de ES se debe considerar el estado de madurez de la fruta más que la época de cosecha (Huelin y Coggiola, 1968; Watkins, 1993). Los índices de madurez para definir la cosecha usados comúnmente en peras incluyen firmeza de pulpa, el cambio del color de fondo (Hansen y Mellenthin, 1980) y el test de almidón (Watkins, 2003), no así el etileno, el cual no está gatillado al momento de cosecha en peras de invierno (peras que requieren de un periodo de frío para inducir su madurez). El mejor indicador de madurez en peras, a cosecha y post cosecha es la firmeza de pulpa, especialmente durante la guarda en frío (Hansen y Mellenthin, 1980; Zoffoli *et al.*, 1998; Gil, 2012).

Altas incidencias de ES fueron encontradas con índices de almidón a cosecha menores a 5.3 (escala del 1 al 7) en manzanas Starkrimson Delicious (Blanpied *et al.*, 1991). En Granny Smith frutos inmaduros a cosecha fueron más susceptibles a ES (Anet, 1972). Además, Bramlage, (1993) agrega que la susceptibilidad disminuye a medida que la fruta presenta un mayor estado de madurez en manzanas.

Estudios de Zoffoli *et al.* (1998) demostraron que peras D'Anjou y Packhams de cosechas más tardías (firmezas de pulpa menores a 56N respecto a 68N a cosecha en peras D'Anjou) y 63N respecto a 73N en Packham's fueron más resistentes a ES, solo a los 120 días de guarda y peras Barttler fueron más resistentes con estados más inmaduros de la fruta. Sin embargo, Moggia *et al.* (2005) no encontró un efecto de las cosechas sobre la incidencia de ES en peras cv. Packham's Triumph. Contrario a lo anterior Calvo *et al.* (2015) mostró que peras del cultivar Beurré D'Anjou expresaron mayor incidencia de escaldado en estados más avanzados de madurez. Además, la incidencia de ES depende no sólo de la producción de etileno, sino que también de los cambios en la producción de α -farneseno, trienoles y al potencial antioxidante durante el almacenaje (Calvo *et al.*, 2015).

Biomarcadores de ES

Actualmente en peras, no existe un biomarcador para ES. El primer metabolito propuesto para determinar la sensibilidad de manzanas (cvs. Cortland y Delicious) a escaldado superficial fueron los trienoles conjugados. Los trienoles Tc258 y Tc281, ambos productos de la autocatalización del α -farneseno y la catálisis de estos con especies radicales libres aumentan y consecuentemente

aumentó la manifestación de escaldado en la fruta (Du y Bramlage, 1993). La relación Tc258/Tc281 menor a 1 la fruta manifiesta ES, mejor relacionada a las cosechas tempranas. Lurie y Watkins (2012) indicaron que cuando la relación Tc258:Tc281 fue ≤ 1.0 la susceptibilidad a ES fue mayor. Sin embargo, esta relación entre los trienoles 258 y 281 solo puede ser cuantificada en el tiempo después del segundo y tercer mes, proponiendo a Tc281 como un indicador (Biomarcador) de ES en manzanas cv. Granny Smith (Moggia *et al.* 2010). La inconsistente información del efecto de la madurez de la fruta, así como también el efecto de bajas temperaturas sobre la incidencia de ES en peras, dejan al grupo de las peras susceptibles a ES sin estrategias para segregar la fruta susceptible a cosecha y minimizar así los recursos en tecnologías de post cosecha para los productores. Por lo tanto, se hace necesario la búsqueda de biomarcadores o modelos predictivos para ES en peras. Otro biomarcador propuesto fue MHO, compuesto que fue inicialmente encontrado en muy bajas concentraciones en manzanas con ES (Anet, 1972). Posteriormente Mir *et al.* (1999) identificaron este compuesto 8000 veces alto en manzanas Cortland con ES respecto a manzanas aplicadas con DPA. Sin embargo, Whitaker (2007) en un estudio en peras cv. D'Anjou identificó a MHO en la piel de la fruta, encontrándose en mayor proporción en fruta con ES. Sin embargo, cuando reprodujo el daño, no obtuvo la expresión de síntomas de ES. Por lo tanto concluyo que MHO es solo un subproducto volátil poco probable de ser el causante de la necrosis de ES.

Con respecto a posibles antioxidantes involucrados con ES, fue evaluado el potencial antioxidante fenoles, α -tocoferol, ascorbato, glutatión y carotenos (Anet, 1974; Barden y Bramlage, 1994), donde ES no fue relacionado con ningún antioxidante en particular en manzanas. En peras, se ha encontrado que ascorbato y glutatión disminuyen muy rápido durante los primeros 20 días de guarda en peras cv. Conference, (Larrigaudiere *et al.*, 2001). Posteriormente Calvo *et al.*, (2018) encontró que cuando el ascorbato disminuye a los 60 días de guarda, un máximo de α -farneseno y un incremento posterior de los Tc en peras Beurre D'Anjou, la incidencia de ES aumentaba, y cuando la fruta era tratada con 1-MCP fueron observados. Cuando los niveles de ascorbato a los 20 días fueron mayores, un menor contenido de α -farneseno y trienoles fueron cuantificados, consecuentemente la fruta no desarrolló ES. Dado lo anterior, ascorbato cumpliría un rol importante en evitar el desarrollo de ES.

Otros metabolitos asociados al desorden fueron identificados por Rudell *et al.* (2009) quienes evaluaron cambios en los niveles de beta-sitosterol y campesterol conjugados en la piel de manzanas durante el desarrollo de ES en el almacenaje. Estos compuestos tienen un rol en la membrana plasmática, en la permeabilidad (Schuler *et al.* 1991), sin embargo, los niveles encontrados en ambos compuestos en manzanas fueron estables (sin cambios) durante la guarda,

solo beta-sitosterol aumentando cuando la fruta era sometida a temperatura ambiente durante la expresión de ES.

Actualmente en peras, no existe un biomarcador para ES, en este estudio se busca identificar metabolitos asociados a escaldado superficial en etapas tempranas de la guarda de la fruta en frío. Para ello se realizó el seguimiento de los niveles de metabolitos principalmente flavonoides, volátiles y fitoesteroles durante el desarrollo de ES en peras cv. Packham's Triumph.

DETERMINACIÓN DE METABOLITOS ASOCIADOS A ESCALDADO SUPERFICIAL DURANTE LA POST COSECHA DE PERAS, PROVENIENTE DE DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS, ESTADOS DE MADUREZ Y TRATAMIENTOS DE POST COSECHA (DPA Y 1-MCP)

DETERMINATION OF METABOLITES ASSOCIATED WITH SUPERFICIAL SCALD DURING POSTHARVEST PERIOD IN FRUIT FROM DIFFERENT GROWING REGIONS, HARVEST MATURITY, AND POSTHARVEST TREATMENTS (DPA AND 1-MCP)

RESUMEN

El escaldado superficial (ES) es un importante desorden fisiológico en peras (*Pyrus communis* L.). La etiología del ES ha sido ampliamente investigada en manzanas, pero escasamente en peras. Bioquímicamente, los compuestos 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO), 6-metil-5-hepten-2-ol (MHOL), antioxidantes del tipo fenólicos y algunos fitoesteroles han sido relacionados a ES en manzanas, pero no en peras. El objetivo de este estudio fue identificar metabolitos (volátiles, semi-polares y no polares) asociados a ES como futuros predictores de ES en peras cv. Packham's Triumph.

El experimento fue realizado durante la temporada 2016/17 en peras cv. Packham's Triumph con diferentes estados de madurez, cosechadas desde diferentes zonas productivas. La fruta fue almacenada en frío convencional (FC; -1°C, >90% HR) por 210 días, más 14 días a temperatura ambiente (20°C) para determinar la incidencia de ES. De las peras se extrajo la piel a cosecha y de diferentes momentos durante la guarda (15, 45, 180 y 210 días) las que fueron congeladas a -80°C. Posteriormente, fueron extraídos los compuestos volátiles, semi-polares y no polares y luego cuantificados mediante el uso de cromatografía gaseosa (GC-MS) y líquida (uHPLC-MS), respectivamente. Análisis multivariados (PCA, PLS-DA) fueron utilizados para identificar metabolitos asociados a diferentes niveles de incidencia de ES (0=sin a 4=>50% incidencia). Durante los primeros 45 días de guarda los trienoles Tc258 y Tc269 fueron significativamente asociados al ES en las categorías de mayor incidencia (3-4) expresado a los 180 y 210 días de guarda más 14 días a temperatura ambiente. Posteriormente a los 180 y 210 días de guarda la epicatequina fue encontrada en mayor concentración en fruta sin incidencia de ES, mientras que los trienoles Tc 258 y Tc69, MHO y la procianidina A2 fueron encontrados en mayor proporción en fruta con ES. Durante el desarrollo del escaldado superficial en peras, estarían participando procesos oxidativos no enzimáticos durante la etapa de almacenaje en frío de la fruta y paralelamente antioxidantes del grupo de las catequinas estarían relacionadas inversamente con la expresión de ES, las cuales al final del almacenaje, durante la exposición a temperatura ambiente de la fruta participarían en procesos de polimerización.

ABSTRACT

Superficial scald (SS) is an important physiological disorder in pears (*Pyrus communis* L.). The etiology of ES has been widely researched in apples, but poorly in pears. Biochemically, the compounds 6-methyl-5-hepten-2-one (MHO), 6-methyl-5-hepten-2-ol (MHOL), phenolic antioxidants and some phytosterols have been related to ES in apples, but not in pears. The aim of this study was to identify metabolites (volatile, semi-polar and non-polar) associated with SS in order to identify potential predictors of SS on winter pears. The experiment was carried out during the 2016/17 season in pears cv. Packham's Triumph with different maturity stages, harvested from different growing conditions. The fruit was then stored in refrigerated rooms with regular atmosphere (RA; -1°C, >90% Relative humidity) for 210 days. Superficial Scald assessment was conducted after 180 and 210 days into storage plus 14 days at room temperature (20°C). Fruit skin was sampled at different harvest and storage (15, 45, 180, and 210 days) times, and stored at -80°C. Subsequently, the volatile, semi-polar and non-polar compounds were extracted and quantified using gas and liquid chromatography (GC-MS; uHPLC-MS).

Multivariate analyses (PCA, PLS-DA) were used to identify metabolites associated with different levels of SS incidence (0= non damage to 4=>50% incidence). During the first 45 days of storage, trienols Tc258 and Tc269 were significantly associated with SS in categories of highest incidence (3-4) after 180 and 210 days of storage. At both time-points epicatechin was found in higher concentration in fruit without SS, while Tc258 and Tc269, MHO and procyanidin-A2 were found in a higher amount in fruit with SS. On the other hand, catechins appear to be inversely related to the expression of SS. However, these last parts of the storage, during exposure to the ambient temperature of the fruit, will participate in the polymerization processes.

Keywords: Superficial scald, pears, metabolite.

INTRODUCCIÓN

El escaldado superficial (ES) es el desorden fisiológico más importante económicamente en países productores de manzanas y peras (Calvo y Colodner, 2014). El ES se manifiesta en la fruta almacenada por largos periodos a bajas temperaturas (más de 2 meses a 1-4°C) (Watkins *et al.*, 1995). Los síntomas son manchas superficiales de color pardo en la piel de los frutos, abarcando de cuatro a cinco capas de epidermis (Watkins *et al.*, 1995) y estas sólo aparecen después de un periodo de 7 a 14 días a temperatura ambiente. En manzanas, el primer compuesto asociado a ES fue el α -farneseno, descrito por Anet (1972) como el precursor del desorden. Producto de la oxidación del α -farneseno a compuestos volátiles, sesquiterpenos presentes en la cutícula de la piel de los frutos, se gatilla el desarrollo del pardeamiento típico del desorden (Lurie and Watkins, 2012). El α -farneseno se acumula en la piel del fruto durante la madurez, alcanzando su concentración más alta luego de 12 semanas de guarda (Barden & Bramlage, 1994) en manzanas y peras (Chen *et al.*, 1990; Isidoro & Almeyda, 2006; Whitaker *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2015) sin embargo, este compuesto está indirectamente relacionado con el desorden. El etileno es otro compuesto indirectamente asociado a ES, el cual durante el almacenaje incrementa su producción y a la vez induce la expresión del gen de la α -farneseno sintetasa, enzima responsable de la biosíntesis de α -farneseno (Rupasinghe *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2007), aproximadamente 4 semanas antes de aparecer el metabolito (Pechous *et al.*, 2005). Productos de la oxidación del α -farneseno son los trienoles conjugados (Tc, hidroperóxidos o endoperoxidos de farnesil) abundante en las absorbancias de 258, 269 y 281 nm (Anet, 1972). Estos trienoles se expresan como Tc258, Tc 269 y Tc281 por su abundancia en las longitudes de ondas antes descritas. Los trienoles han sido directamente relacionados con la manifestación de ES después de los 120 días de almacenaje en frío. Finalmente, los trienoles derivan, producto de continuas oxidaciones, en cetonas identificadas como 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO) y 6-metil-5-hepten-2-ol (MHOL), encontrándose positivamente correlacionada con la incidencia de ES (Anet, 1972; Mir *et al.*, 1999; Rudell *et al.*, 2009), sin embargo al igual que los trienoles, su correlación es al final del almacenaje. En peras se han detectado α -farneseno, trienoles y MHO pero en muy bajas concentraciones en la piel de la fruta (Anet, 1974; Rudell *et al.*, 2009, Hui *et al.*, 2016) y sus correlaciones con la incidencia de ES han mostrado patrones similares a las manzanas pero sólo después de los 120 días de guarda (Calvo *et al.*, 2015; Hui *et al.*, 2016; Calvo *et al.*, 2018). El retraso de la manifestación de ES en peras podría estar condicionado por el etileno y a resistencias naturales, proponiéndose a los antioxidantes presentes en los tejidos epidermales al momento de cosecha y durante el almacenaje como responsables de ello (Huelin, 1964; Calvo *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). Incluso la susceptibilidad

al escaldado que se observa entre cultivares podría estar determinado por diferencias en la concentración de antioxidantes naturales en la piel del fruto (Meir and Bramlage, 1988; Barden and Bramlage, 1994; Calvo *et al.*, 2015). Los antioxidantes α -tocoferol, ascorbato, glutatión, algunos fenoles y carotenos (Anet, 1974; Barden y Bramlage, 1994) fueron evaluados en manzanas, donde ES no se manifiesta si el contenido de antioxidantes previene o mantiene la autoxidación de α -farneseno limitada. En peras cv. Conference se ha encontrado que el ascorbato y glutatión disminuyen muy rápido durante los primeros 20 días de guarda (Larrigaudiere *et al.*, 2001). Posteriormente Calvo *et al.* (2018) encontró una reducción del ascorbato a los 60 días de guarda, un máximo de α -farneseno y un incremento posterior de los Tc en peras cv. Beurre D'Anjou, con un consecuente aumento de la incidencia de ES. Opuesto a esta condición, fruta fue tratada con 1-MCP aumentó los niveles de ascorbato y redujo el contenido de α -farneseno y trienoles, con una ausencia de ES en la fruta. Dado lo anterior, el ascorbato cumpliría un rol importante en la prevención del ES.

Otros metabolitos asociados al desorden fueron identificados por Rudell *et al.* (2009) quien evaluó cambios en los niveles de beta-sitosterol y campesterol conjugados en la piel de manzanas durante el desarrollo de ES en almacenaje. Estos compuestos tienen un rol en la membrana plasmática, en la permeabilidad y fluidez (Schuler *et al.*, 1991), sin embargo, los niveles encontrados de ambos compuestos en manzanas fueron estables (sin cambios) durante la guarda, solo aumentos de beta-sitosterol-glucosilado con la expresión de los síntomas de ES.

Un gran número de metabolitos han sido asociados a ES en manzanas, sin embargo en peras la manifestación del desorden sigue patrones diferentes que aún no han podido entenderse, dificultando el uso de controles efectivos contra el desorden.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

El estudio se realizó en tres zonas climáticas diferentes. La primera, “San Fernando” se consideró una zona fría por su acumulación de días grados (GDA, en base 10°C desde el 1 octubre al 28 febrero) en promedio de 950, ubicada en la precordillera, colindante con el río Colchagua, representada por su huerto Talcahue. La segunda “Molina”, zona cálida por sus 1300 GDA, localizada en el valle central con 2 huertos El Pirhuin 11 y 3, la diferencia de los huertos 3 y 11 es que este último se encuentra a l orilla de un estero, con bruma matinal e historial de eventos de granizo durante el periodo estival. La tercera zona fue “San Clemente”, huerto “Agrofruta”, con 1150 GDA, zona intermedia, localizada en el valle central 150 km más al sur de Molina. La información climática fue extraída de la estación meteorológica Agromet. Todos son huertos comerciales, con óptimos manejos en precosecha. Además fueron incorporados las horas frío acumuladas (HFA) 45 días antes de la fecha de floración (respecto a cosecha temporada anterior), los índices bioclimáticos fueron calculados de acuerdo a la metodología de Stanley *et al.* (2000).

Huerto	Localización	Comuna	GDA>10°C (G)	HFA<10°C (H)
Talcahue	34°38'16.58"S,70°53'11.63"O	San Fernando	950	33
Pirhuin 11 y 3	35°2'27.47"S,71°15'7.76"O	Molina	1300	16
Agrofruta	35°35'12.61"S,71°28'56.02"O	San Clemente	1150	8

En cada huerto se cosechó peras (*Pyrus communis* L.) cultivar Packham's Triumph. La fruta cosechada desde 10 árboles homogéneos en carga y vigor por huerto, fue separada al azar en 3 repeticiones. Cada cosecha fue realizada 7 días antes de cosecha comercial (dato histórico de cada huerto), a cosecha comercial y 7 días después de cosecha comercial. El marco de plantación en los tres huertos fue de 2,5 x 4 m teniendo un total de 1.000 plantas/ha. y una orientación de hileras de Este a Oeste. Todos los árboles están conducidos sobre eje central con una altura de 3 metros con riego californiano o tendido.

Experimento

El ensayo consideró varios factores entre estos 3 zonas productivas, 3 estados de madurez a cosecha, 5 puntos de muestreo de metabolitos durante el almacenaje (0, 15, 45, 180 y 210 días) y 3 tratamientos de post cosecha (difenilamina, DPA; dosis 1.000 ppm) y 1-metilciclopropeno (Smartfresh®; 1-MCP 320 ppb) al momento de cosecha. Como testigo fruta sin tratamiento. Las evaluaciones de ES fueron a los 180 más 14 días a temperatura ambiente y a los 210 días más 14 días a temperatura ambiente. El sistema de guarda fue frio convencional (FC) a -1°C y una humedad relativa superior al 85%. La fruta se almacenó embolsada (plástica con 9% de perforaciones) en cajas plásticas de 18 kilos.

Tratamientos de post-cosecha

Las aplicaciones de post cosecha fueron realizadas al momento de cosecha. El volumen de fruta tratada fue de 600 frutos por huerto y al momento de cosecha (1.800 frutos en total/huerto). Cada tratamiento fue individual, con DPA en una dosis de 1.000 ppm, 1 amino ciclopropeno (1-MCP) a una dosis de 320 ppb y un tercer tratamiento correspondió a fruta sin tratamiento (Control).

DPA: las aplicaciones de DPA (1000 ppm) fueron realizadas mediante inmersión por 1 minuto en una solución acuosa. La fruta fue escurrida en mallas para eliminar el exceso de solución, y al cabo de 2 horas los frutos secos fueron ubicados en bandejas plásticas de 18 kilos para su posterior almacenaje en frío.

1-MCP: la aplicación de este compuesto (Smartfresh®) fue de forma volátil, la fruta se ubica en una cámara de 0,62 m³, luego una dosis de 320 ppb de formulación 1-MCP se mezclan con 10mL de agua tibia (a 35°C), se sella la cámara y mediante agitación se liberó el gas de 1-MCP dentro de la cámara generándose una concentración de 320 ppb. El gas debió hacer acción por 24 horas, antes de abrir la cámara. Posterior al tiempo de aplicación la cámara fue abierta y la fruta fue puesta en bandejas para almacenarlas en frio convencional.

Evaluaciones

a) Índices de madurez

Los índices de madurez evaluados fueron masa (g) y diámetro (cm) a cosecha, además de la concentración interna de etileno (CIE, ppm), color de piel (a, b, L, Hue), firmeza de pulpa (lb) y el test de almidón (escala 1-6). En cada monitoreo se evaluaron 4 repeticiones de 5 frutos cada una

por condición. La masa fue registrada en una balanza digital (Ohaus, modelo Scout Pro SP60, Nueva Jersey, USA) y los datos expresados en gramos. El diámetro fue medido en la zona ecuatorial del fruto con un pie de metro (Vernier Caliper 150x0,05 mm) expresado en mm. La concentración interna de etileno consideró 3 repeticiones de 3 frutos cada una, para ello se extrajo 1 ml de gas de pulpa en cada lado del fruto, en la zona ecuatorial y fue inyectado en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890, Serie II), a una temperatura del inyector a 150°C, por una columna C-18 HP, por 2 minutos a una temperatura de horno de 80°C según metodología de Moggia *et al.* (2007), expresado en ppm. El color de piel ($L/a^*/b^*$, Hue) fue medido con un colorímetro (Minolta Crometer CR-200b), en lados opuestos de la zona ecuatorial de la pera, registrando los valores de a (carácter rojo a verde, en ausencia de amarillo o azul), b (carácter amarillo a azul, en ausencia de rojo o verde) y ángulo Hue representando el color (Hunter, 1942; Little, 1975). La firmeza de la pulpa fue evaluada en la zona ecuatorial de lados opuestos del fruto, mediante un presionómetro digital Fruit Tester Analyzer (FTA, modelo Guss GS-14, SA) con un vástago de 9 mm de diámetro, los valores expresados en libra (lb). Finalmente, el test de almidón fue realizado en un corte transversal de la fruta en la zona ecuatorial, luego de 10 minutos después de la aplicación de una solución de Lugol (solución de 1,2% yodo con 2,4% yoduro de potasio) el nivel de degradación de almidón fue evaluado utilizando una tabla de referencia comercial para peras cv. Packham's Triumph en una escala numérica de 0,5 (degradación nula) a 6 (degradación máxima).

b) Metabolitos

b.1. Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles fueron extraídos y cuantificados usando los métodos de Ferreira *et al.* (2009), Rudell *et al.* (2009) y Hui *et al.* (2016), este último modificándose para una extracción de compuestos mediante micro-extracción de fase sólida (SPME). Para el método de SPME se utilizó una fibra de polidimetilsiloxano 100 μm PDMS (código 57300-U Sigma Aldrich, MO, USA) permitiendo extraer los compuestos de la muestra por medio de adsorción por 30 minutos del tejido congelado, triturado y calentado a 35°C en agitación constante en una solución salina saturada (Hui *et al.*, 2016). Se inyectó la muestra en un cromatógrafo Focus GC (Thermo Scientific, MA, USA) con una columna Rxi®-5Sil MS de 30m x 0,25mm (Restek PA, USA) con un detector masa selectiva DSQ II simple cuadrupolo (Thermo Scientific, MA, USA). Las condiciones fueron ajustadas de acuerdo a las descrito por Rudell *et al.* (2009) y Hui *et al.* (2016) se optimizó el rango de lectura de masas 100 a 600 m/z, en una rampla de 20 min, de 50 a 250° C, con un tiempo de desorción de 5 min a 350 °C. Se utilizaron los estándares de cis- α -farneseno, 6-metil-5-hepten-2ona

y 6-metil-5-hepten-2-ol (Sigma Aldrich, MO, USA) en metanol (Merck® grado LC-ms) en concentraciones de 4,2 a 114 ng/uL, 2,8 a 84,4 ng/uL y 4,3 a 115ng/uL, respectivamente. Otro grupo de volátiles fue identificado utilizando la librería NIST-msms (Mass Spectrometry Data Center, MA, USA), incorporada en el software Xcalibur 3.0.63 del sistema GC-MS. Los resultados fueron expresados en Abundancia relativa (Abun.Rel.), usándose un estándar interno para todas las muestras.

b.2. Fitoesteroles

De acuerdo al método descrito por Rudell *et al.* (2011), se extrajeron fitoesteroles, pesando 500 mg de piel, usando 10 µL de colesterol como estándar interno a una concentración de 1mg/100mL (Sigma Aldrich, MO, USA) con un volumen de 0,71 mL de acetona/0.2M HEPES (pH 7,7) (Sigma Aldrich, MO, USA) y todo en oscuridad. La muestra fue agitada(Vortex Mixer SI 200 MRC, FRA, Alemania) y centrifugada por 15 segundos a 2.000 g (PrimsR C 2500, Labnet International, NJ, USA). El sobrenadante fue separado (Extracto 1) y nuevamente se adicionó 0,71 mL de acetona/0,2M HEPES (pH 7,7) al pellet agitándose y centrifugándose por segunda vez. El segundo sobrenadante (Extracto 2) fue adicionado al primer extracto. El pellet fue lavado con 0,7mL de acetona 2 veces y luego extraído nuevamente con 0,75 ml de hexano puro. Luego de una centrifugación por 30 segundos a 13.000 g, el extracto de hexano fue agregado a los extractos 1 y 2 y agitados, posteriormente fue secado con nitrógeno gaseoso la fase superior (hexano). La muestra luego fue reconstituida utilizando 250 µL de acetona y filtrada con una membrana de teflón (PTFE) Ø 50 mm 0,45 µm. Diez µL de muestra fueron inyectados en un cromatógrafo líquido de ultra presión Thermo Dionex, modelo Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA) con una columna Chromolith® Performance RP-18e (4,6 x 100 mm) fase reversa monolítica (Merck, NJ, USA) con detector de masas Orbitrap LC-MS (Thermo Scientific, MA, USA). La inyección fue conducida en una fase móvil al 80%de metanol(A) y 100% etanol (B) en un gradiente de 0 a 100% B en 20 minutos. Las condiciones fueron una ionización positiva de 0,5KV en HESI, a una temperatura capilar de 420°C, un flujo de 0,250mL/min en gas Nitrógeno 35 unidades y un barrido de 90 a 1200 m/z. Se realizaron curvas de calibración utilizando los estándares de β-sitosterol y campesterol en un gradiente de concentraciones de 80 a 240 ηg con 6 diluciones. Los datos fueron expresados en ηg·100g peso fresco⁻¹.

b.3. Fenoles

La extracción de flavonoides fue realizada según Rudell *et al.*, (2009). 350 mg de piel de pera fueron homogenizados con 5 mL de metanol al 75% (Merck, NJ, USA) y 100 μ L de naringenina a una concentración de 6mg/100mL (estándar interno, Sigma Aldrich, MO, USA). Posteriormente, fue centrifugado el extracto (Prims R C2500, Labnet International, NJ, USA) durante 10 minutos a 2.000 g. El sobrenadante y 20 mL de agua grado HPLC (Merck, NJ, USA) fueron homogenizados para luego fijar los fenoles en una columna de extracción de fase solida (SPE) Bon Elut C18 (Agilent Technologies, CA, USA) previamente hidratada. Finalmente, los fenoles fueron eluidos con n-propanol grado HPLC (Merck, NJ, USA). El extracto fue concentrado con nitrógeno gaseoso y reconstituido en 200 μ L de metanol grado HPLC, para ser inyectado (1 μ L) a un sistema cromatografía líquida de ultra presión con detector de masas (uHPLC-MS) Thermo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA) equipado con una columna Water C18 (Water Corp., MA, USA) y un detector de masas Orbitrap simple cuatropolo (Thermo Scientific, MA, USA). La fase móvil utilizada fue de 85% acetonitrilo con 5% ácido fórmico y en agua (Solución A) y 85% metanol y 5% ácido fórmico y en agua (Solución B) en un gradiente de 0 a 100% B a los 24 minutos. Se utilizó una ionización positiva de 2,5KV en HESI, con una temperatura capilar de 340°C, un flujo de gas Nitrógeno 35 unidades, con un barrido de 90 a 1200 m/z. Se realizó una curva de calibración de 25 estándares (Cuadro 1) en concentraciones promedio de 2 a 80 ng/ μ L. Los resultados se expresaron en μ g \cdot 100g peso fresco⁻¹de tejido.

Cuadro 1. Compuestos, tiempo de retención (RT) y masa ion analizados con cromatografía de gas masa y uHPLC masa, usando librería NIST-msms y estándares analíticos extraídos de peras cv. Packham's Triumph.

Tipo de compuesto	Compuesto	Tiempo retención	m/z
Fitoesteroles	Campesterol	23,06	413,22
	beta-sitosterol	6,32	368,30
Ésteres	α -copaeno	13,01	204,36
	6-metil-5-hepten-2-ona (MHO)	7,51	126,60
	6 metil-5-hepten-2-ol MHOL)	7,61	128,21
	(E,E)- α -farneseno	13,70	204,36
	(Z,E)- α -farneseno	14,51	204,35
	Cadina-1 (10) (4-diene)	14,51	204,35
	n-butil acetato	4,46	116,16
	Etil-trans-cis-2,4 decadienoato (cis-3-hexanal)	13,94	196,29
Fenilpropanoides	Apigenina (Flavona)	16,05	268,23
	Apigenina-7-O-glucosido	17,69	431,14
	Arbutina (Hidroquinona glucosilada)	0,60	292,04
	Catequina (Flavonol)	1,05	290,26
	Cianidina (Flavonoide)	1,75	287,02
	Daizeína (Isoflavona)	7,00	255,04
	Epigallocatequina-3-O-galato (Flavanol)	1,33	459,14
	Epicatequina-3-O-galato (Flavanol)	2,78	443,05
	Epicatequina (Flavanol)	1,30	291,06
	Hiperósido (Quercitina-3-O-galactosido)	2,73	465,05
	Ideaina (Cianidina-3-O-galactosido)	0,60	489,05
	Isorhamnetina-3-O-glucosido (Flavonol-metilado)	18,72	478,27
	Isorhamnetina-3-O-rutinosido (Flavonol-metilado)	4,43	479,07
	Kaempferol (Flavonol)	19,17	284,30
	Kaempferol-3-O-rutinosido (Flavonol glucosido)	4,02	595,10
	Kaempferol-3-O-glucosido (Flavonol glucosido)	4,63	449,06
	Quercitina (Flavonol glucosilado)	7,86	303,02
	Quercitrina (Quercitina-3-O-glucosido)	18,76	447,15
	Procianidina A2 (polímero de flavonol)	3,06	577,07
	Rutina (Quercitina-3-rutinosido)	2,43	611,09
	Ácido gálico (ácidos fenólicos)	0,76	153,00
	Ácido Cafeico (ácidos fenólicos)	1,40	163,02
	Ácido hidrocínámico (ácidos fenólicos)	7,79	125,97

b.4. Compuestos asociados a escaldado superficial

Los compuestos α -farneseno, trienoles Tc258, Tc269, Tc281 y Tc290 fueron determinados según Isidoro y Almeida (2006). Se extrajo piel en la zona ecuatorial de un pool de 4 frutos por repetición por tratamiento, huerto y cosecha. Se tomaron discos de 1cm² de piel, estos fueron sumergidos en un vaso precipitado con 5ml de hexano puro. Después la solución se agitó a temperatura ambiente (20-25°C) en un agitador termoregulado (Shaker-incubador modelo ES-20/60) a 50 rpm, por 10

minutos. Posterior se filtró la muestra a través de un papel filtro con una bomba de vacío (Welch, modelo 2545C-02). El extracto final fue aforado a 5 ml de hexano. Finalmente se midió la absorbancia del extracto a 200, 232, 258, 269, 281 y 290 nm con un espectrofotómetro (Biosan, Pharo 300).

La determinación de la concentración de α -farnaseno fue utilizando el coeficiente de extinción molar de 29.000 y para los trienoles el coeficiente de extinción molar fue 25.000 según la metodología propuesta por Anet (1972). La concentración de trienos conjugados en su máximo de absorción representado como la diferencia entre cada trieno conjugado y 290nm como OD258-290, OD269-290, OD281-290, expresados como Tc 258, Tc269 y Tc281. La capacidad antioxidante (AO) fue obtenida con la fórmula propuesta por Meir *et al.* (1988) mediante espectrometría, a una longitud de onda de 200 nm, expresando sus valores en OD \cdot 1000cm².

c) Incidencia de escaldado superficial

La cuantificación de la incidencia de escaldado superficial fue realizada según Isidoro y Almeyda (2013) determinando el porcentaje de fruta afectada por ES. Adicionalmente, la fruta fue agrupada en categorías de incidencia, así 1= 0 % ES, 2= 1-25 %, 3= 26-50 % y 4= >51 %.

Análisis estadístico

Inicialmente los metabolitos fueron tratados como variables y ES como variable respuesta, mediante análisis multivariados, tales como Componentes Principales (PCA) y de Discriminante Cuadrados mínimos Parciales (AD-CMP), usando el software MetaboAnalyst con R, versión 3.4.3. Fue posible identificar compuestos que explicaron las diferentes categorías de la incidencia de ES. Mediante una ANOVA- simple fueron identificados los metabolitos asociados a las categorías de ES. Las diferencias significativas entre los niveles de los metabolitos y las categorías de escaldado fueron obtenidas por una separación de medias mediante el test Tukey (HSD) con un $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Madurez de la fruta

Al momento de cosecha, la fruta presentó diferencias significativas de al menos 1 libra en firmeza de pulpa y 0,5 puntos en el test de almidón, entre la primera y tercera cosecha (Cuadro 2). Con respecto al color verde expresado en Hue (°H) la fruta con mayor intensidad provino de la cosecha temprana (C1) y cosecha comercial (C2), respecto a la cosecha tardía (Cuadro 2). Con respecto a los huertos, Talcahue presento siempre fruta con menos intensidad verde. En los huertos Agrofruta, Pirhuin 3 y 11 la fruta presentó mayor degradación de almidón en las cosechas tardías, mientras que en el Huerto Talcahue la degradación de almidón fue similar en todas las cosechas. Con respecto a la firmeza, la fruta del huerto Talcahue presentó significativamente una menor firmeza respecto a la fruta de los otros huertos. Mientras que los frutos de las cosechas tardías presentaron significativamente menor firmeza respecto a la cosecha temprana y comercial (Cuadro 2).

A cosecha se ha reportado que fruta con firmezas entre 15,8 a 14,9 lb, y con test de almidón en 2,8 en manzanas han manifestado a los 5 meses de guarda incidencias sobre 70% de ES, mientras que firmezas de 14,4 lb y un test de almidón de 4,4 han manifestado incidencias de 6% de escaldado, revelando que cosechas tardías de manzanas presentan menos incidencia de ES (Diamantidis *et al.*, 2002). En peras Beurré D'Anjou cosechas con 15,1 lb y 12,5% de degradación de almidón (cosecha temprana) la fruta manifestó a los 180 días de guarda un 55% de ES, respecto a una cosecha tardía con 12,2 lb de firmeza y un 47% de degradación de almidón, la fruta presento a 33% de ES (Calvo *et al.*, 2015). Por lo tanto diferencias de madurez de 3 lb de firmeza entre la cosecha temprana y tardía pueden expresar diferencias en los niveles de ES después de guarda.

Luego de 180 días de almacenaje fruta control de la cosecha temprana procedente del huerto Pirhuin 3 terminó más firme que los otros huertos (Cuadro 3). Por el contrario, fruta del huerto Pirhuin 11 presentó similar estado de madurez al final de la guarda en todas sus cosechas, sin diferencias significativas (Cuadro 3). Fruta de la C1 y C2 del huerto Agrofruta fue similar en madurez, solo la cosecha 3 se mantuvo más firme, contrario a lo ocurrido en Talcahue, en donde la C2 fue menos firme y más amarilla (Cuadro 3).

Cuadro 2. Índices de madurez de peras cv. Packham's Triumph de cuatro zonas productivas cosechadas en tres momentos, temprana (C1), comercial (C2) y tardía (C3) evaluadas al momento de cosecha, en la temporada 2016/17.

Factor		Índices de Madurez				
		Firmeza pulpa (lb)	Test Almidón escala (1-6)	Color		
				a	b	Ángulo HUE
Huerto: A	Agrofruta	16,6 b ¹	1,8	-19,5 b	41,8 b	-65,0 b
	Talcaehue	16,3 a	1,5	-20,2 b	40,9 a	-63,8 a
	Pirhuín 11	16,7 b	1,8	-19,6 b	41,9 b	-65,0 b
	Pirhuín 3	16,5 b	1,6	-19,0 a	41,4 a	-65,3 b
	Valor P	0,0000	0,0000	0,0002	0,4303	0,0000
Cosecha: B	C1	17,3 b	1,4	-19,8 b	41,3 a	-64,4 a
	C2	16,4 b	1,5	-19,7 b	41,6 b	-64,6 a
	C3	15,4 a	2,1	-19,2 a	41,7 b	-65,3 b
	Valor P	0,0000	0,2223	0,0242	0,0101	0,0002
AxB	Agrofruta C1	17,5	1,4 a	-19,3	40,8	-64,8
	Agrofruta C2	16,3	1,6 ab	-19,6	41,8	-64,8
	Agrofruta C3	15,7	2,5 c	-19,5	42,8	-65,3
	Talcaehue C1	17,3	1,4 a	-19,4	42,0	-63,1
	Talcaehue C2	16,9	1,6 ab	-19,3	41,3	-63,6
	Talcaehue C3	15,4	1,5 ab	-18,8	41,4	-64,4
	Pirhuín 11 C1	17,6	1,5 ab	-20,0	42,0	-64,5
	Pirhuín 11 C2	17,2	1,3 a	-19,8	42,0	-64,8
	Pirhuín 11 C3	15,4	2,6 c	-19,0	41,7	-65,5
	Pirhuín 3 C1	16,4	1,4 a	-20,7	42,0	-65,1
	Pirhuín 3 C2	15,3	1,4 a	-20,3	41,1	-65,0
	Pirhuín 3 C3	15,0	1,9 b	-19,8	41,1	-65,7
	Valor P	0,1852	0,0000	0,3952	0,0971	0,8698

Nota: ¹Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test Tukey HSD 95% ($P \leq 0,05$), $n = 20$.

Cuadro 3. Índices de madurez y ES en peras cv. Packham's Triumph de cuatro zonas productivas, cosechadas en tres momentos, temprana (C1), comercial (C2) y tardía (C3) evaluadas a los 180 + 1 día de almacenaje, en la temporada 2016/17.

Factor	Índices de Madurez					
		Firmeza pulpa (lb)	Test Almidón Escala (1-6)	Color		
				a	b	Ángulo HUE
Huerto: A	Agrofruta	13,2	6	-13,0 a ¹	44,0	-74,5 c
	Talcarehue	13,3	6	-13,7 a	40,1	-71,8 b
	Pirhuín 11	13,8	6	-13,0 a	39,6	-71,5 b
	Pirhuín 3	14,7	6	-14,9 b	41,7	-67,5 a
	Valor P	0,0000	-	0,0000	0,0000	0,0000
Cosecha: B	C1	14,0	6	-13,8	39,5	-70,7
	C2	13,3	6	-15,3	44,5	-71,6
	C3	14,1	6	-13,8	40,1	-80,0
	Valor P	0,0079	-	0,0877	0,0000	0,2932
AxB	Agrofruta C1	11,9 a	6	-12,0	41,3 c	-76,8
	Agrofruta C2	13,2 a	6	-14,5	49,4 d	-73,6
	Agrofruta C3	14,6 b	6	-12,4	41,5 c	-73,3
	Talcarehue C1	13,8 b	6	-12,8	39,6 b	-71,9
	Talcarehue C2	12,5 a	6	-15,1	41,2 b	-71,8
	Talcarehue C3	13,6 ab	6	-13,1	39,4 c	-71,6
	Pirhuín 11 C1	13,8 b	6	-13,6	39,6 b	-71,3
	Pirhuín 11 C2	13,9 b	6	-13,3	39,4 bc	-71,4
	Pirhuín 11 C3	13,8 b	6	-12,0	40,0 b	-71,9
	Pirhuín 3 C1	16,3 c	6	-14,1	37,6 a	-65,7
	Pirhuín 3 C2	13,5 ab	6	-13,1	48,2 d	-69,7
	Pirhuín 3 C3	14,3 b	6	-17,5	39,4 b	-67,1
	Valor P	0,0000	-	0,9620	0,0000	0,2213

Nota: ¹Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test Tukey HSD 95% ($P \leq 0,05$), $n = 20$.

Metabolitos a cosecha

Los volátiles más abundantes encontrados en la piel de peras al momento de cosecha fueron (E,E)- α -farneseno ($\text{ng} \cdot \text{gPF}^{-1}$) y (Z,E)- α -farneseno (Abu.Rel.) (Anexo 1).

Con respecto a los niveles de fitoesteroles, el contenido de beta-sitosterol y campesterol a cosecha en la fruta fueron de $0,0157 \text{ nmol} \cdot \text{gPF}^{-1}$ y $0,0129 \text{ nmol} \cdot \text{gPF}^{-1}$ respectivamente (Anexo 1), muy diferente a lo encontrado por Rudell et al. (2011) quien reportó niveles de $200\text{-}250 \text{ nmol} \cdot \text{g PF}^{-1}$ de beta-sitosterol y entre $10\text{-}15 \text{ nmol} \cdot \text{g PF}^{-1}$ de campesterol en la piel de manzanas.

Los principales flavonoides extraídos de la fruta al momento de cosecha fueron cianidina, apigenina e isorhamnetina-3-*O*-rutinosido, mientras que los menores niveles fueron quercitina, quercitrina y procianidina A2 (Anexo1).

En general, los flavonoides encontrados en este estudio han sido descritos en diferentes cultivares de peras, y son derivados del kaempferol, apigenina (Kolniak-Ostek, 2016), quercitina e isorhamnetina, en diferentes cantidades (Schieber *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2003). Las peras cv. Packham's Triumph se caracterizan por presentar altos niveles de isorhamnetina glucosilada y menores de quercitina glucosilada (Schieber *et al.*, 2001; Lin y Harnly, 2008), similar a los niveles encontrados en este estudio a cosecha. Además, se detectaron altos niveles de ácido gálico y ácido cafeico (ácido hidrocínámico) a cosecha, similar a lo descrito por Galvis *et al.* (2003).

Incidencia de Escaldado superficial

Frutos control desarrollaron ES después de 120 días de almacenaje, con incidencias inferiores al 8% (datos no mostrados), aumentando la incidencia entre un 33 a 78% luego de 180 días de almacenaje en fruta de diferentes cosechas y huertos. A los 210 días de guarda las incidencias fueron superiores al 80% (Figura 1, C y F).

Frutos tratados con DPA (Figura 1A) no manifestaron ES a los 180 días, excepto fruta del huerto Pirhuin 11 de cosecha tardía con aplicación de DPA, la cual expresó un 3% de incidencia (Figura 1A). A los 210 días de guarda la incidencia de escaldado aumentó en los tratamientos de DPA. Fruta de los huertos Agrofruta, Talcahue y Pirhuin 11 tratada con DPA presentó incidencia desde un 5 a un 40%, mientras que el huerto Pirhuin 3 no presentó ES. El rol de antioxidante de la DPA consistente reduce los niveles de trienoles, por lo tanto la inhibe la oxidación de α -farneseno (Huelin y Coggiola, 1970). Por lo tanto podemos indicar que el huerto Pirhuin 3 mantuvo muy bajos los trienoles en la fruta tratada con DPA, ya que nunca presentó incidencia de ES. Además la fruta tratada con DPA del huerto Pirhuin 11 procedente de la tercera cosecha mantuvo bajos los trienoles, mientras que la cosecha temprana, los trienoles aumentaron con mayor incidencia de ES.

El tratamiento con 1-MCP en la fruta (Figura 1B) logró reducir la incidencia de ES en un 100% hasta los 180 días de guarda, esto responde al efecto de 1-MCP sobre la fruta, inhibiendo la síntesis de etileno por el bloqueo de los receptores de etileno, retrasando la producción de etileno e

indirectamente retrasando la síntesis de α -farneseno por la inhibición de la α -farneseno sintetasa, enzima dependiente de la señal de etileno (Lurie *et al.*, 2005). A los 210 días de guarda, las incidencias de ES en fruta tratada con 1-MCP varían entre un 3 a un 22% en los huertos Talcahue y Pirhuin 11 (Figura 1B y 1E), esto se debe al aumento de receptores de etileno (Lurie *et al.*, 2005). La fruta tratada con 1-MCP de los huertos Agrofruta y Pirhuin 3 no manifestaron ES.

Entre los huertos y cosechas, la fruta control presentó diferentes patrones de manifestación de ES, fruta de Talcahue a los 180 días presentó las menores incidencias de ES en todas las cosechas respecto a los otros huertos (Figura 1C). Posteriormente a los 210 días de guarda, la fruta del mismo huerto incrementó la incidencia de ES desde la primera a la tercera cosecha, mientras que la fruta de los otros huertos no varió la incidencia de ES entre las cosechas (Figura 1F.). Resultados similares fueron encontrados por Calvo *et al.* (2015) en peras D'Anjou en cosechas tardías las cuales presentaron mayor incidencia de ES, mientras que Zoffoli *et al.* (1998) reportó mayor incidencia de ES en peras D'Anjou y Packham's en cosechas tempranas y en cosechas tardías en peras cv. Bartlett. Peras Bartlett producidas en California el año 2006 no presentaron diferencias en la incidencia de SS entre la cosecha temprana y tardía (Whitaker *et al.*, 2009). Los resultados confirman que no hay un efecto, consistente entre temporadas, de la madurez a cosecha en la fruta sobre la incidencia de ES.

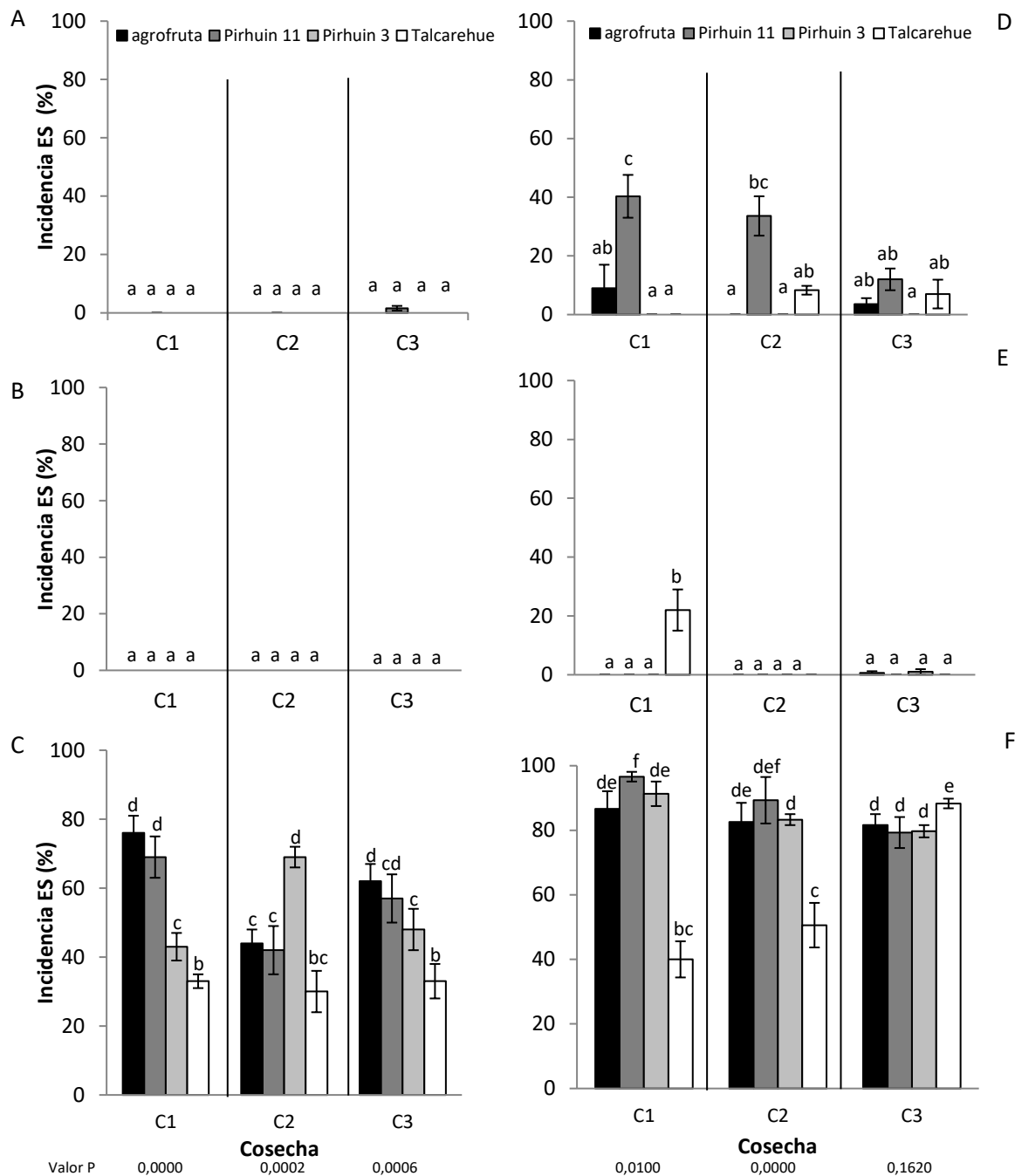


Figura 1. Incidencia promedios de escaldado superficial (ES) después de 180 (izquierda) y 210 (derecha) días de almacenaje más 14 días de a temperatura ambiente (22°C) en peras cv. Packham's Triumph procedente de 4 huertos, tres cosechas (C1, C2 y C3) y tratadas con DPA (1000ppm; A, D), 1-MCP (320 ppb; B, E) y testigo sin tratar (C, F). Barras indican desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre la interacción entre los huertos y tratamientos de post cosecha.

Metabolitos asociados al escaldado superficial (ES)

El análisis exploratorio de componentes principales (CP) y análisis de discriminantes de mínimos cuadrados mínimos parciales (PLS-DA) para relacionar volátiles, flavonoides y fitosteroles cuantificados a cosecha con las categorías de ES luego de 180 (categorías del 2 al 4) y 210 (categorías del 3 al 4) días más 14 días a temperatura ambiente, se muestran en la Figura 2. Los primeros dos componentes explicaron solo un 37,1% de la varianza (Figura 2A), con un tercer componente principal varía un 48,4%. El análisis PLS-DA solo explicó un 27,7% de la varianza (Figura 2C), con tres componentes logra un 39,3%, no logrando diferenciar las categorías de ES.

En la relación de los metabolitos a cosecha con la incidencia de ES a los 210 días de guarda, el CP explicaron en un 21,1% de la varianza (Figura 2D). Mientras que el PLS-DA solo logró explicar en un 21,1% la varianza (Figura 2F). A pesar de los bajos porcentajes se logra diferenciar las categorías 3 y 4. La categoría 4 presenta una relación inversa con los niveles de la capacidad antioxidante ($OD \cdot 1000cm^2$) (Figura 2B y 2E).

Mediante un análisis de varianza se determinaron los metabolitos significativamente relacionados a ES en etapas tempranas de la guarda en frío. A cosecha el análisis de varianza no reportó metabolitos significativos asociados a las categorías 2, 3 y 4. Del mismo modo a los 210 días de guarda en fruta con escaldado en categorías 3 y 4 (ES >26% incidencia) no se encontraron metabolitos asociado significativamente a las categorías del daño.

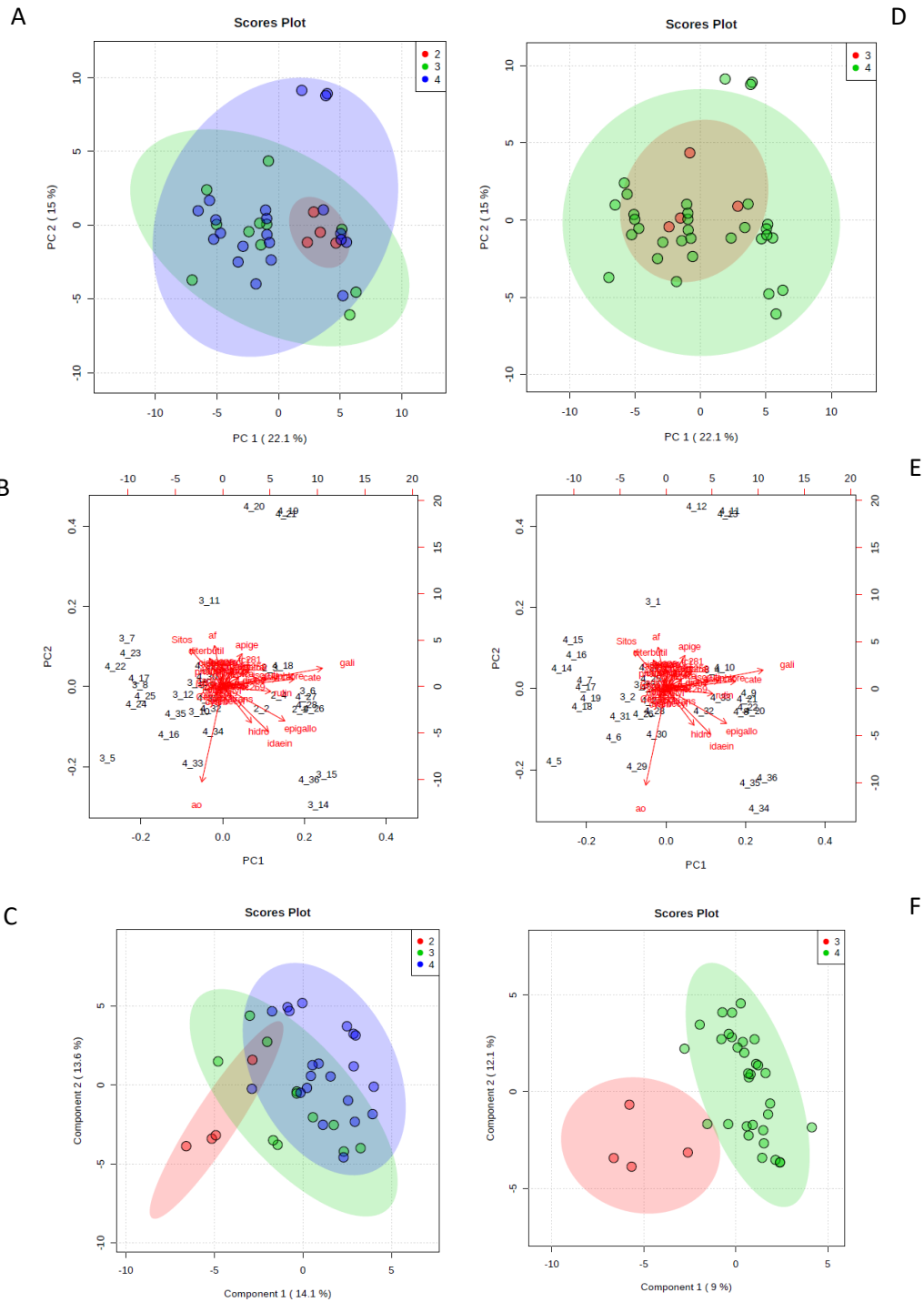


Figura 2. Análisis de componentes principales (CP; A y D), CP y su interacción con variables (B y E) y análisis de discriminantes (PLS-DA; C y F) que muestran los compuestos volátiles, flavonoides y fitoesteroides evaluados a cosecha y su relación con fruta en diferentes categorías de incidencia de escaldado superficial (1-4) evaluada a los 180 (A, B y C) y 210 (D, E y F) día de almacenaje más 14 días a temperatura ambiente (22°C).

Después de 15 días de guarda en frío los niveles de flavonoides y fitoesteros fueron relacionados al ES superficial expresado a los 180 y 210 días de guarda mediante un ACP. El CP1 y CP2 explicaron solo un 39,5% y 44,3% de la varianza, a los 180 y 210 días, respectivamente, similar a la relación encontrada con los metabolitos evaluados a cosecha (Figura 3A y 3D).

Las categorías 1 y 4 lograron diferenciarse a los 180 y 210 días de guarda, significativamente en el análisis PLS-DA (Figura 3C y 3F). Por lo tanto, la concentración de metabolitos en la fruta a los 15 días podrían explicar la expresión a futuro de ES.

Los metabolitos cuantificados a los 15 días de almacenaje fueron analizados con respecto a ES a los 180 y 210 días de guarda, considerando la fruta control y tratada (DPA y 1-MCP). Del total de metabolitos, 5 flavonoides, 2 fitosteros y 2 trienos fueron relacionados significativamente con ES a los 180 días (Cuadro 4). A los 210 días solo 3 flavonoides fueron significativos, mientras que los trienos y los fitoesteros fueron los mismos encontrados a los 180 días.

Dado que en PLS-DA (Figura 3C y 3F) las categorías 1 y 2 siempre están asociadas, los metabolitos Tc258, Tc269, Daidzeina, Catequina y el ácido cafeico (Cuadro 4) y su relación con ES a los 180 explican al menos 2 niveles de ES ($3 \neq 1$ y $4 \neq 1$). Los otros metabolitos descritos en el Cuadro 4, solo explican las diferencias entre la categoría 1 y 4, dejando a la fruta con una incidencia de 1 al 50% sin criterio de selección, es decir la concentración de un metabolito no podrá categorizarse en las categorías 2 y 3 de incidencia de escaldado o será erradamente asignada, ya que la categoría 4 es igual a 2 y 3, y la categoría 1 es igual a 2 y 3.

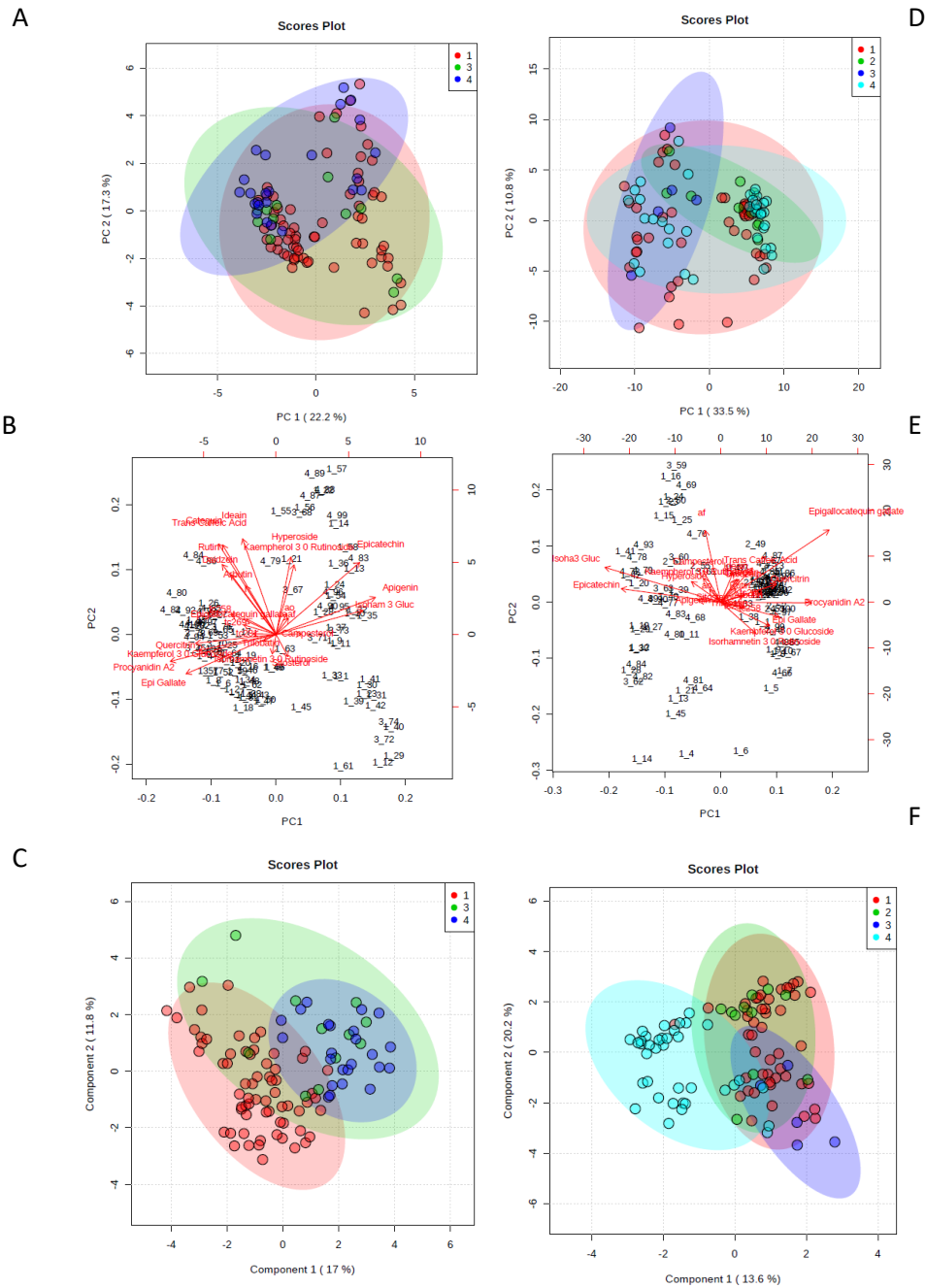


Figura 3. Análisis de CP (A y D), PC y su relación con las variables (B y E) y PLS-DA (C y F) muestran los compuestos flavonoides y fitoesteroles evaluados a los 15 días de almacenaje y su relación con fruta en diferentes categorías (1-4) de incidencia de escaldado superficial evaluada a los 180 (A, B y C) y 210 (D, E y F) días de almacenaje más 14 días a temperatura ambiente (22°C).

Cuadro 4. Análisis ANOVA entre los flavonoides y fitoesteroles significativamente diferentes respecto a ES , evalualos a los 15 días de guarda y ES evaluado a los 180 y 210 días de guarda más 14 días a temperatura ambiente.

Guarda(días)	Compuesto	Valor P	Tukey(HSD)^a
180	Tc258	0,00	3-1; 4-1
	Tc269	0,00	3-1; 4-1
	beta-sitosterol	0,00	4-1
	Ideaina	0,00	4-1
	Rutina	0,00	4-1
	Daidzeína	0,00	4-3; 4-1
	Catequina	0,00	4-3; 4-1
	Ácido Cafeico	0,00	4-3; 4-1
	Campesterol	0,04	4-1
210	Tc 258	0,00	4-1;4-2;4-3
	Tc269	0,00	4-1;4-2;4-3
	Arbutina	0,00	3-1;3-2;3-4
	Ideaina	0,00	4-1;4-3
	beta-sitosterol	0,00	4-1
	Daidzeína	0,00	4-1
	Campesterol	0,00	4-1
	Rutina	0,00	4-1
	Catequina	0,00	4-3

^a En la Columna del test Tukey se entregan en forma pareada las diferencias significativas entre las categorías de escaldado (números del 1 al 4). En donde los números corresponden a las categorías de ES, números seguidos de guiones (-) indica diferencias significativas entre las categorías.

Los metabolitos extraídos luego de 45 días de guarda lograron explicar con un CP1 y CP2 un 34,5% la varianza, en donde las fruta sin escaldado y con una incidencia < 25% (Categoría 1 y 2 respectivamente) se diferenciaron de los frutos con >26% de incidencia de ES, principalmente por mayores niveles de campesterol y epigallocatequina de galato, conjuntamente con menores niveles de α -farneseno (Figura 4C). Estudio de Rudell et al. (2011) reportó en manzanas que los niveles de campesterol y beta-sitosterol se mantenían constantes durante el almacenaje en frio, en fruta con y sin DPA, encontrando concentraciones de 200 nmol·g PF⁻¹ de campesterol y 10nmol·g PF⁻¹de beta-sitosterol en una relación 1:20 en manzanas. En estudio en peras se encontró 0,0129 nmol·gPF⁻¹ de campesterol y 0,0157nmol·gPF⁻¹ de beta-sitosterol, en una relación 0,8:1, donde los mayores niveles de campesterol fueron relacionados con menores incidencias de escaldado. Yoshida y Niki (2003) encontraron que los fitoesteroles tendrían un efecto protector de membranas lipídicas, cuya consecuencia fue un retraso en el consumo de α -tocoferol a 1- palmitoil-2linoleoil fosfatidilcolina (PCPL)y un menor contenido de lípidos oxidados en presencia de fitoesteroles (Yoshida y Niki, 2003). Si bien en este estudio no se midió el contenido de α -tocoferol, reportes de Rudell y Matheis

(2009) indican que este antioxidante lipídico disminuye durante el almacenaje de manzanas, con el consecuente incremento de ES.

A los 45 días, además de campesterol la epigallocatequina de galato fue otro metabolito asociado a ES (Figura 4C). El grupo de las catequinas, las epicatequinas y epigallocatequinas son fácilmente oxidadas por la polifenoloxidasas (Nortje y Koeppen, 1965) además, las galocatequinas tienen una alta capacidad antioxidante contra la peroxidación de lípidos en la piel de fruta (Someya *et al.*, 2002), sin embargo, en las peras no hay reportes al respecto, a pesar de que se han encontrado en altas concentraciones en el cv. Packham's Triumph (Ozturk *et al.*, 2015; Galvis *et al.*, 2003) similar a lo encontrado en este estudio (en promedio $0,224\text{ug}\cdot\text{gPF}^{-1}$ cosecha).

Al relacionar los metabolitos evaluados a los 45 días con la incidencia ES a los 210 días de guarda, el CP1 y CP2 explicaron solo un 39% de la variabilidad (Figura 4C y 4D), en donde nuevamente menores rangos de ES (categoría 1 y 2) coincidieron con mayores niveles de epigallocatequina galato (Figura 3D). Este compuesto podría estar influyendo en la susceptibilidad de la fruta a desarrollar escaldado superficial, Calvo *et al.* (2015) observaron que una baja capacidad antioxidante en la fruta al momento de cosecha tenía relación directa con altas incidencias de ES durante la guarda, proponiendo que antioxidantes específicos podrían explicar mejor la susceptibilidad a ES que cuando se considera una cuantificación general de antioxidantes. El grupo de las catequinas y en este caso, la epigallocatequina de galato, son consideradas efectivos antioxidantes por su alta capacidad de remoción de radicales (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2005). Las epicatequinas y catequinas son capaces de sacar 2 grupos radicales del medio acuoso, lo cual es superado solo por quercetina que logra sacar 4 radicales del medio (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2005). Estos eficientes antioxidantes podrían transformarse, una vez oxidados, en quinonas que luego de varias polimerizaciones generan compuestos de color pardo (Robards *et al.*, 1999). Por lo tanto, mayores niveles de epigallocatequina de galato temprano durante la guarda de la fruta podrían relacionarse con menores incidencias de ES a los 45 días.

Frutos con mayores incidencias de ES a los 180 y 210 días de guarda mostraron una asociación con Tc258 y Tc269 (Figura 4B y 4D). Resultados similares, en peras D'Anjou y Packham's Triumph en donde menores incidencias a ES fueron asociadas a una alta relación Tc258/Tc281 (Zoffoli *et al.* 1998). En manzanas el trienol 281 fue asociado con alta incidencia de ES en Granny Smith (Du y Bramlage, 1993; Moggia *et al.*, 2010; Lurie y Watkins, 2012).

De los metabolitos extraídos a los 45 días, el análisis de varianza seleccionó a 2 trienoles, α -farneseno, epigallocatequina galato y al campesterol, particularmente los mismos compuestos fueron encontrados asociados a ES a los 180 y 210 días de guarda (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis ANOVA entre los flavonoides y fitoesteroles significativamente diferentes evaluados a los 45 días de guarda y ES evaluado a los 180 y 210 días de guarda más 14 días a temperatura ambiente.

Guarda(días)	Compuesto	Valor P	Tukey (HSD)^a
180	Tc 258	0,00	3-1;4-1;3-2;4-2
	Tc269	0,00	3-1;4-1;3-2;4-2
	α -farneseno	0,00	3-1;4-1;4-2
	Epigallocatequina galato	0,00	3-1
	Campesterol	0,00	3-2;4-2
210	Tc 258	0,00	4-1;4-2;4-3
	Tc269	0,00	4-1;4-2
	α -farneseno	0,00	2-1;3-2;4-2
	Campesterol	0,00	4-1; 4-3
	Epigallocatequina galato	0,00	4-2

^a En la Columna del test Tukey se entregan en forma pareada las diferencias significativas entre las categorías de escaldado (números del 1 al 4). En donde los números corresponden a las categorías de ES, números seguidos de guiones (-) indica diferencias significativas entre las categorías.

Sin embargo, la epigallocatequina de galato solo discriminó la categoría 1 de 3 a los 180 días (Cuadro 5). Los otros metabolitos descritos en el cuadro 5 lograron discriminar al menos 2 categorías hasta de escaldado a los 45 días de guarda, un mayor número de categorías respecto a los 15 días. Dado lo anterior, los 45 días podría ser un buen momento para discriminar el futuro escaldado en peras Packham's Triumph.

Los metabolitos evaluados a los 15 y 45 días de guarda, significativamente relacionados a las categorías de ES mediante análisis de varianza fueron correlacionados a ES mediante el test de Pearson (Cuadro 6).

Cuadro 6. Coeficiente de correlación Pearson (r) entre los metabolitos evaluados a los 15 y 45 días de guarda, asociados significativo sobre la expresión futura del ES a los 180 y 210 días de guarda.

Guarda (días)	Metabolitos	ES (180 días)	ES (210 días)
		r	r
15	Tc258	0,7642	0,7308
	Tc269	0,5439	0,4794
	beta-sitosterol	-0,3923	-0,3277
	Ideaina	0,2980	0,2750
	Rutina	0,2884	0,3190
	Daidzeina	0,2492	0,2383
	Catequina	-	0,2757
	Ácido Cafeico	0,3080	-
	Campesterol	-0,1807	-0,1862
	Arbutina	-	0,0393
	45	Tc 258	0,7949
Tc269		0,5504	0,5172
α -farneseno		0,5698	0,5469
Epigallocatequina galato		-0,2132	-0,2184
Campesterol		-0,0113	-0,0617

Los metabolitos con un coeficiente de Pearson superior a 0,7 fueron los trienoles Tc258, seguido por Tc269 con un $r < 0,54$, otro metabolito importante fue α -farneseno con un $r = 0,57$ pero solo a los 45 días.

Dado lo anterior, del total de metabolitos solo los trienoles (Tc258 y Tc269) y α -farneseno son los únicos metabolitos potenciales biomarcadores, los cuales han sido reportados en manzanas cvs. Cortland y Delicious, estableciendo una relación de Tc258:Tc281, la cual cuando disminuyó, consecuentemente aumentó la manifestación de escaldado en el tiempo (Du y Bramlage, 1993). Lurie y Watkins (2012) indicaron que cuando CT258:CT281 fue ≤ 1.0 la susceptibilidad a ES fue mayor. Sin embargo, esta relación, solo es válida después de los 2 a 3 meses de guarda. Otros estudios han propuesto a Tc281 como un biomarcador de ES en manzanas cv. Granny Smith (Moggia *et al.* 2010). Giné *et al.* (2013), en manzanas Granny Smith obtuvo una correlación positiva entre la incidencia de ES y la tasa de acumulación de Tc258-281/2 (δTc) en el tiempo de guarda ($\delta Tc / \delta t (T_n - T_0)$). Mostró un punto de inflexión en el cual la tasa de acumulación de trienoles aumenta exponencialmente y el desorden se manifiesta. En peras D'Anjou y Packham's Triumph fue probada la relación Tc258/281, encontrando una alta relación en frutos en ambos cultivares durante el periodo de susceptibilidad, encontrándose a Tc281 muy bajo. Sin embargo, el Tc281 no se correlacionó con la incidencia de ES en el cv. D'Anjou, si en el cv. Packham's con un $r = 0,81$.

Al correlacionar linealmente los trienoles significativos encontrados, Tc258 y Tc269, estos se correlacionaron con un $r = 0,72$ y $0,77$ a los 15 días de evaluados con ES a 180 y 210 días de guarda

para Tc258, mientras que para Tc269 solo se correlacionó con un $r=0,50$ y $0,53$ respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Regresión lineal entre los metabolitos significativamente relacionados con ES a los 180 y 210 días de guarda.

Guarda (días)	Metabolitos	ES a los 180 días		ES a los 210 días	
		r	valor P	r	valor P
15	Tc258	0,725	0,000	0,771	0,0000
	Tc269	0,509	0,000	0,533	0,0000
	beta-sitosterol	-0,397	0,000	-0,318	0,0012
	Ideaina	0,308	0,002	0,298	0,0024
	Rutina	0,291	0,003	0,308	0,0017
	Daidzeina	0,257	0,010	0,240	0,0154
	Catequina	-	-	0,295	0,0027
	Ácido Caféico	0,320	0,001	-	-
	Campesterol	-0,181	0,069	-0,195	0,0505
	Arbutina	-	-	0,050	0,6180
	45	Tc 258	0,781	0,000	0,779
Tc269		0,551	0,000	0,542	0,0000
α -farneseno		0,580	0,000	0,549	0,0000
Epigallocatequina galato		-0,206	0,024	-0,226	0,0134
Campesterol		0,002	0,979	-0,085	0,3531

Los resultados solo lograron identificar a los trienoles Tc258 y Tc269 como potenciales biomarcadores en peras cv. Packhams Triumph. Sin embargo se logró identificar nuevos metabolitos asociados a la expresión final del desorden (procianidinas y flavonoides glucosilados). Además un grupo de flavonoides y fitoesteroles significativamente identificados en forma temprana podría estar incidiendo en la susceptibilidad de los frutos a ES. Estudios en estos metabolitos con mayor detalle son propuestos.

Durante el almacenaje, el ES se manifestó después de los 180 días de guarda, al relacionar los niveles de metabolitos antes de los 14 días a temperatura ambiente con la incidencia de ES posterior a la exposición a temperatura ambiente (vida de anaquel), el CP1 y CP2 explican un 60,8% de la variabilidad (Figura 5A). El AD-CMP reportó una varianza del 51%, sin embargo, no existió una buena diferenciación entre las categorías de incidencia de ES (Figura 5C).

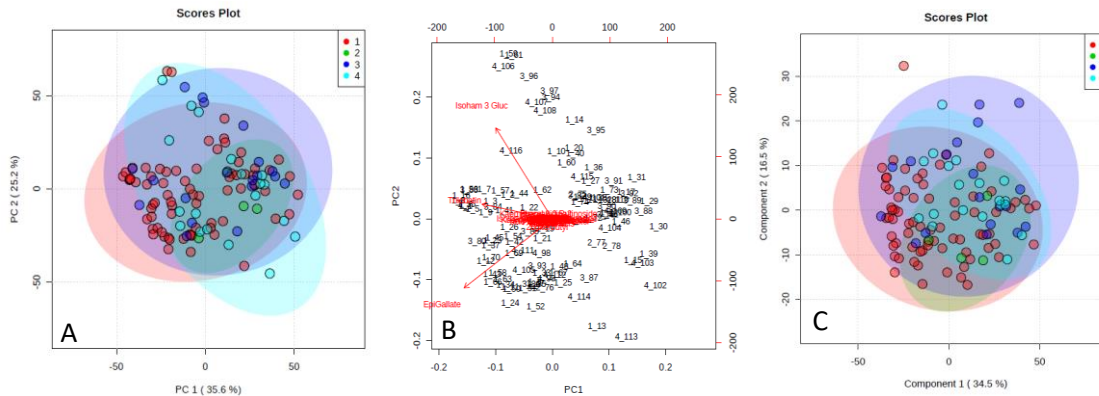


Figura 5. Análisis CP y PLS-DA que muestra los compuestos volátiles, flavonoides y fitoesteroles evaluados a los 180 días de almacenaje y su relación con fruta en diferentes categorías (1-4) de incidencia de escaldado superficial evaluada a los 180 día de almacenaje más 14 días a temperatura ambiente (22°C).

Finalmente, a los 210 días de guarda la fruta sana correspondió, en mayor proporción, a fruta tratada con 1-MCP; la fruta testigo presentó alta incidencia de ES (>78%) y fruta con DPA incidencias de ES >5% (Figura1D). Al relacionar los metabolitos evaluados a los 210 días, antes de expresar ES, con la incidencia posterior, el PC1 y PC2 explicaron solo un 24,3% de la varianza (Figura 6A). En donde las categorías 2 y 4 de ES están asociadas a mayores niveles de volátiles y menor contenido de MHO, la categoría 3 asociada positivamente con niveles de epicatequina de galato y MHO y la categoría 1(fruta sana) no asociada a ningún metabolito en particular (Figura 6B). La fruta con 1-MCP podría no haber recuperado en su totalidad la sensibilidad a etileno, y consecuentemente su maduración (Watkins *et al.*, 2000; Calvo, 2004). Además se ha reportado que 1-MCP podría estar induciendo la actividad de catalasa, peroxidasa y ascorbato peroxidasa, las cuales reducen los niveles de peróxido, posibles responsables de las oxidaciones de α -farneseno y trienoles en el desarrollo de ES (Larrigaudiere *et al.*, 2004). Además bajos niveles de peróxido han sido reportados en peras Blanquilla tratadas con 1-MCP, las cuales no han manifestado ES en post cosecha (Larrigaudiere *et al.*, 2004).

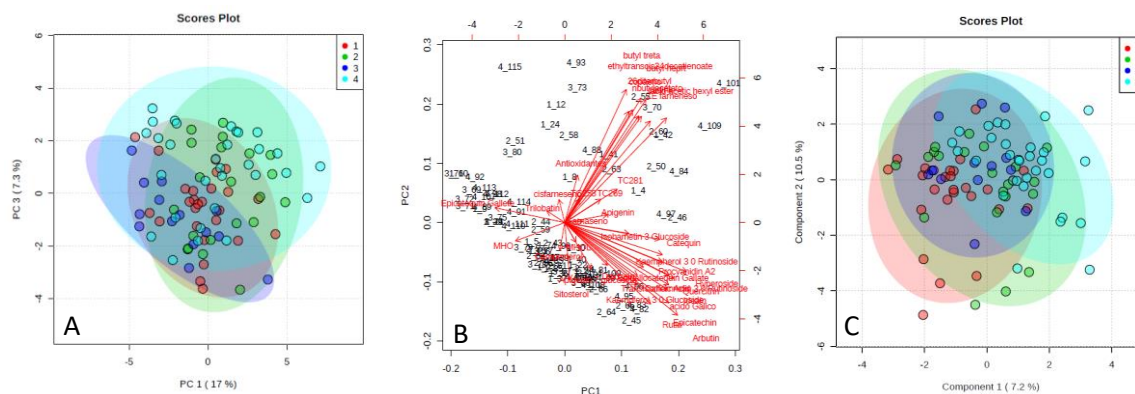


Figura 6. Análisis CP y PL-SDA que muestra los compuestos volátiles, flavonoides y fitoesteroles evaluados a los 210 días de almacenaje y su relación con fruta en diferentes categorías (1-4) de incidencia de escaldado superficial evaluada a los 210 día de almacenaje más 14 días a temperatura ambiente (22°C).

El efecto de los metabolitos a los 180 días previo a la manifestación de escaldado superficial (después de 14 días a temperatura ambiente) sobre ES, la molécula MHO logró diferenciar las categorías, solo no discrimino las diferencias entre 1 y 2, sin embargo el PLS-DA (Figura 3) mostró que estas categorías están totalmente asociadas en un mismo grupo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis ANOVA entre los flavonoides, volátiles y fitoesteroles significativamente diferentes evaluados a los 180 y 210 días de guarda y ES en sus respectivas evaluaciones.

Guarda(días)	Compuesto	Valor P	Tukey (HSD) ^a
180	Epicatequina	0,00	4-1
	a-farneseno	0,00	4-1;4-3
	MHO	0,00	3-1;4-1;3-2;4-2
	Ideaina	0,00	4-1
	Tc258	0,00	4-1
	Tc281	0,05	4-1
	Quercitrina	0,05	4-1
210	Procianidina A2	0,00	2-1;4-1;4-3;3-2
	Kaempferol-3-O-rutinosido	0,00	4-1;4-3;3-2
	Ácido gálico	0,00	4-1;4-3;3-2
	Hiperosido (quercitina-3-O-galactosido)	0,00	2-1; 3-2; 4-2
	Isorhamnetina-3-O-glucosido	0,01	3-2; 4-3

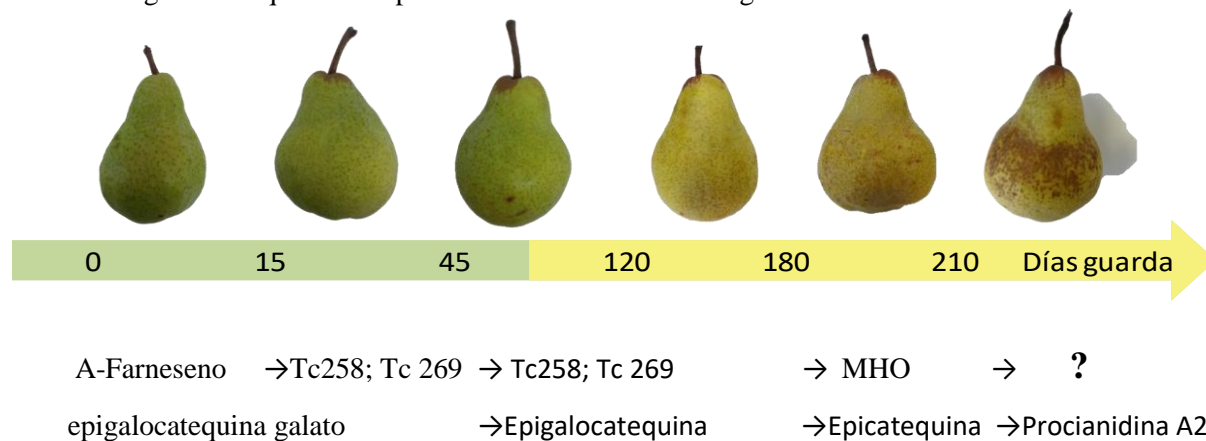
^a En la Columna del test Tukey se entregan en forma pareada las diferencias significativas entre las categorías de escaldado (números del 1 al 4). En donde los números corresponden a las categorías de ES, números seguidos de guiones (-) indica diferencias significativas entre las categorías.

A los 210 días de guarda el análisis PLS-DA (Figura 6) reportó que MHO fue capaz de discriminar entre las categorías de daño por ES. Además los metabolitos que afectan significativamente a ES cambian, encontrándose a Procianidina A2 discriminando gran parte de las categorías, acompañado de varios flavonoides glucosilados (Cuadro 6).

Del total de 8 combinaciones de diferencias entre las categorías de ES, solo se logró discriminar 4 combinaciones, sin embargo hay combinaciones que no son de interés, por ejemplo 4-3, 3-2, 2-4 siendo las combinaciones más importantes 1-2, 1-3, 1-4, combinaciones que diferencian fruta con y sin ES. El análisis solo logra diferenciar las categorías 1-3 y 1-4 a los 15 y 45 días solo con los metabolitos Tc258 y Tc269 y a-f en forma temprana en la guarda, mientras que al expresarse el desorden lo hace con MHO y procianidina A2 a los 180 y 210 días respectivamente.

El proceso inicial, oxidativo no enzimático, del escaldado superficial, el cual a partir de α -farneseno y sus consecuentes productos (trienoles) los cuales durante un largo periodo de almacenaje son acumulados y nuevamente oxidados a MHOL y finalmente a MHO son observados durante este estudio. Inicialmente en los primeros 45 días los niveles de trienoles Tc258 y Tc269 y α -farneseno son capaces de asociarse significativamente con ES, al mismo tiempo epigallocatequina galato aparece significativamente asociada a ES. En las últimas etapas del desorden, cuando solo falta someter a la fruta a temperatura ambiente, el metabolito MHO aparece relevante a los 180 días. Finalmente a los 210 días aparecer un nuevo metabolito, la procianidina A2, como el metabolito significativamente asociado a ES (Figura 7).

Figura 7. Esquema de aparición de los metabolitos significativamente asociados a ES



De acuerdo a Robards *et al.* (1999) los procesos oxidativos en los cuales participan los fenoles en pardeamientos, pueden ser rápidos donde generalmente están actuando enzimas, o procesos lentos generalmente no enzimáticos. Entre estos, una reacción de polimerización de quinonas puede ocurrir con un amplio rango de compuestos fenólicos. La estabilidad, el color y su ubicación dependen del fenol precursor y el ambiente. Que tan rápido ocurra dependerá del poder de reducción del precursor y la quinona, la reacción puede resultar en un dímero del fenol o una regeneración del fenol, o la transformación de quinonas en largos oligómeros (Robards *et al.*, 1999; Goupi *et al.*, 2003). Las proantocianidinas son oligómeros de flavonoides, principalmente de catequinas y epicatequinas y sus ésteres de ácido gálico. Las procianidinas generalmente son de 4 o más catequinas, son abundantes en manzanas especialmente en Granny Smith y Red Delicious. Generalmente, se las ubica en frutos, semilla y flores, un ejemplo fue lo encontrado en *Prunus cerasus* fueron identificadas en flores, en el estigma ubicadas en las células epidermales, en vacuolas, acompañadas de monómeros de flavan-3-ols y en menor proporción con (-) epicatequina o (+) catequina. La concentración de procianidinas en los frutos en estados inmaduros es alto, los cuales disminuyen en estados maduros, sin embargo en frutos saskatoon (tipo de arándano) los niveles fueron altos en los tejidos hipodermes del fruto (exocarpo), en frutos maduros, ya que estas procianidinas se encontraban en vacuolas grandes e incluso en vesículas pequeñas en la hipodermis (Dai y Mumper, 2015). Es probable que el escaldado superficial en peras, en donde el principal flavonoide es epigallocatequina galato a cosecha, se oxide a sus formas de epicatequinas o epigallocatequinas, las cuales a los 180 días podrían estar enlazándose generando los dímeros de procianidinas A2, las cuales presentaron aumentos en sus niveles en frutas con expresión de síntomas de ES, solo descrito antes por Piretti *et al.* (1996).

CONCLUSIONES

Desde cosecha hasta los 210 días de guarda, periodo en el cual los frutos de pera cv. Packham's Triumph desarrollan escaldado superficial, diferentes metabolitos fueron asociados al desorden. Al inicio de la guarda en frío (15 días) los compuestos significativamente relacionados a ES en peras fueron los Trienoles Tc258 y Tc269, y campesterol. A los 45 días de guarda nuevamente los trienoles fueron asociados con mayores incidencias de escaldado, mientras que campesterol y epigallocatequina de galato fue asociado a fruta sana. A los 180 días de guarda la cetona MHO es relacionada positivamente con ES, al igual que los trienoles 258 y Tc281. Finalmente a los 210 días de guarda, los trienoles (Tc258 y Tc281) y proantocianinas A2 están diferenciando las diferentes categorías de ES.

La evolución de los metabolitos en la fruta durante el almacenaje en frío reveló que el desarrollo de escaldado superficial está relacionado a un grupo más amplio de metabolitos que los hasta hoy descritos, en donde fitoesteroles y flavonoides estarían participando.

LITERATURA CITADA

- Agromet, 2017. Disponible en <https://www.agromet.cl/>. Consultado el 22 de Octubre 2018.
- Alvear, F., 2003. Efectividad de una doble aplicación de DPA en el control de escaldado de manzanas cv. Granny Smith y su relación con los compuestos α -farneseno y trienos conjugados. Memoria de título. Universidad de Talca. Chile
- Andersen, O. y K. Markham, 2005. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. CRC press.
- Anet E., 1972. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. VIII. Volatile products from the antioxidation of Alpha-farnesene. J. Sci. Food Agric. 23: 605-608.
- Anet E., 1974. Superficial scald, a functional disorder of stored apples: XI. Apple antioxidants. J. Sci. Food Agric. 25: 299-304.
- ASOEX, 2018. Export data year book, 2017. Digital book of Chilean Fresh Fruit Exporters Association.
- Barden, C. y W. Bramlage, 1994. Accumulation of antioxidants in apple peel as related to preharvest factors and superficial scald susceptibility of the fruit. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 119: 264-269.
- Barden C. y W Bramlage, 1994. Relations of antioxidants in apple peel to changes in α -farneseno and conjugated trienes during storage and to superficial scald development after storage. Postharvest biol. tec. 4: 23-33.
- Baruah P., y T. Swain, 1959. The action of potato phenolase on flavonoid compounds. J. Sci. Food Agric. 10(2): 125-129.
- Blanpied, G., Bramlage, W., Chu, C., Ingle M., Kushad M., Lau, O. y L. Lister, 1991. A survey of relationships among accumulated orchard hours below 10°C fruit maturity and the incidence of storage scald on "Starkrimson" Delicious apples. Can. J. Plant Sci. 71: 605-608.
- Bower J., Biasi W. y E. Mitcham, 2003. Effect ethylene in the storage environment on quality of 'Bartlett pears'. 28: 371-379.
- Bramlage W. y S. Meir, 1989. A potencial method for predicting susceptibility of apples to superficial scald. Acta Hortic. 258: 397-403.
- Calvo, G. y A. Colodner, 2014. Escaldado superficial, el futuro de su control. INTA EEA Alto Valle. 1p.
- Calvo G., Candan A.P., Civello, M., Giné-Bordonaba J. y C. Larrigaudière, 2015. An insight into the role of fruit maturity at harvest on superficial scald development in 'Beurré d'Anjou' pear. Sci. Hortic. 192: 173-179.

Calvo G., 2016. El escaldado superficial en pera “Beurréd’Anjou”: etiología y desarrollo de sistemas de control. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias. 39-49.

Calvo G., Candan A., Recasens I. y C. Larriagudiere, 2018. The role of endogenous antioxidants in scald development of ‘Beurré D’Anjou’ pears under different storage systems. *Acta Hort.* 1194 (59): 411-418.

Cooper, T. 1982b. Aspectos críticos en desordenes fisiológicos de manzanas. *Boletín técnico Sociedad agrícola de Chile*. 1: 1123-126.

Chen P., Varga D., Mielke E., Facticeau T. y S. Drake, 1990. Control of superficial scald on D’Anjou by ethoxyquin: oxidation of α -farnesene and its inhibition. *J. Food Sci.* 55: 171-180.

Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*; Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L., Eds.; American Society of Plant Physiologists Symposium Publications: Rockville, MD, 2002; pp 1250-1318.

DeLong J. and K. Steffen, 1998. Lipid peroxidation and α -tocopherol content in α -tocopherol-supplement thylakoid membranes during UV-B exposure. *Environmental and Experimental Botany*. 39: 177-185.

Dai J. y R. Mumper, 2015. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.

Diamantidis G., Thomai T., Genitsariotis M., Nanos G., Bolla N. y E. Sfakiotakis, 2002. Scald susceptibility and biochemical/physiological changes in respect to low preharvest temperature in ‘Starking Delicious’ apple fruit. *Sci. Hort.* 92: 361–366.

Dilley D., 1993. Air Separator Technology to control Superficial Scald of Apples Not Chemically Treated. *Washing State Univ. Tree Fruit Postharvest Journal*. 4(2): 39-40.

Du, Z.Y. and W. Bramlage, 1995. Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. *HortScience* 30: 205-209.

Du, Z., y W. Bramlage, 1993. A modified hypothesis on the role of conjugated trienos in superficial scald development on stored apples. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 118: 807–813.

Duran Torrellardona, S. 1983. Frigoconservación de la fruta. Biblioteca Agrícola AEDOS.

Emongor, V.E., Murr, D. y E. Lougheed, 1994. Preharvest factors that predispose apples to superficial scald. *Postharvest Biol. Tec.* 4, 289–300.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A. y D. Neri, 2010. Cherry antioxidants: From farm to table. *Molecules* 15: 6993-7005.

Foreign Agricultural Service, 2018. Fresh deciduous fruit: World markets and trade (Apples, grapes, & pears). United States department of Agricultural, USDA. December.

Galvis Sánchez, A. C., Gil-Izquierdo, A., y M. I. Gil, 2003. Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *J. Sci. Food Agric.* 83(10): 995-1003.

Gao M., Zhou S., Guan J. and Y. Zhang, 2015. Effects of 1-methylcyclopropene on superficial scald and related metabolism in ‘Wujiuxiang’ pear during cold storage. *Journal of Applied Botany and Food quality.* 88: 102-108.

Giné-Bordonaba J., Matthieu-Hurtiger V., Westercamp P., Coureau, C., Dupille E. y C. Larrigaudière, 2013. Dynamic changes in conjugated trienols during storage may be employed to predict superficial scald in ‘Granny Smith’ apples. *LWT Food Sci. Technol.* 54: 535–541.

Girard B. y O. Lau, 1995. Effect of maturity and storage on quality and volatile production of Jonagold apples. *Food Research International.* 28 (5): 465-471.

Gil G., 2006. La producción de la fruta: Frutas de clima templados y subtropical y uva de vino. 590p.

Gil, 2012. Fruticultura: Madurez de la fruta y manejo de postcosecha. Fruta de clima templado y subtropical. Tercera edición. Pontificia Universidad de Chile. 493p.

Goupi P., Amiot M., Richard-forget F., Duprat F., Aubert S. y J. Nicolas, 1995. Enzymatic browning of model solution and Apple extracts by Apple polyphenoloxidase. *J. Food Sci.* 60: 497-501.

Graham, D. y B. Patterson, 1982. Response of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiology* 33: 347-372.

Green S., Friel E., Matich A., Beuning L., Cooney J., Rowan D. y E. MacRae, 2007. Unusual features of a recombinant apple α -farnesene synthase. *Phytochemistry.* 68: 176-188.

Gross K, Wang C. y M. Saltveit, 2002 The comercial storage of fruit, vegetables and florist and nursery stocks. USDA Agr. Hndbk. 66.

Hansen, E. y W. Mellenthin, 1980. Tri-State tree fruit short postharvest Physiology Pears: 29-47.

Huelin, F. y I. Coggiola, 1968. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. IV. Effect of variety, maturity, oiled wraps and diphenylamine on the concentration of α -farnesene in the fruit. J. Sci. Food Agric. 19, 297–301.

Huelin, F. y I. Coggiola, 1970. Superficial scald, a functional disorder of stored apples.V. Oxidation of α -farnesene and its inhibition by diphenylamine. J. Sci. Food Agric. 21: 44-48.

Huelin F., 1964. Superficial scald, a functional disorder of stored apples II. Promoters and inhibitors. Journal of the Science of Food and Agriculture. 15(4): 227 – 236.

Hui, W., Niu, J., Xu, X. y J. Guan, 2016. Evidence supporting the involvement of MHO in formation of superficial scald in “Dangshansuli” pears. Postharvest Biology and Technology. 121: 43 – 50.

Ingle, M. y M. D’Souza, 1989. Physiology and control of superficial scald of apples: A review. HortScience, 24: 28-31.

Isidoro N. y D. Almeida, 2006. α -Farnesene, conjugated trienols, and superficial scald in ‘Rocha’ pear as affected by 1-methylcyclopropene and diphenylamine. Postharvest Biol. Tec. 42: 49–56.

Ju Z., y E. Curry. Stripped corn oil emulsion alters ripening, reduces superficial scald, and reduces core flush in ‘Granny Smith’ apples and decay in ‘d’Anjou’ pears. Postharvest Biol. Tec. 20: 185-193.

Kevers C., Pincemail J., Tabart J., Defraigne J. y J. Dommès, 2011. Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. J. Agric. Food Chem. 59 (11): 6165-6171.

Kolniak-Ostek J., 2016. Content of bioactive compounds and antioxidant capacity in skin tissues of pear. Journal of Functional Foods. 23: 40–51.

Kolniak-Ostek J., 2016. Chemical composition and antioxidant capacity of different anatomical part of pear (*Pyrus communis* L.). Food Chemistry. 23: 491–497.

Larrigaudiere C., Lenthalic I., Pinto E. y M. Vendrell, 2001. Short-term effects of air and controlled atmosphere storage on antioxidant metabolism in conference pears. J. Plant Physiol. 158: 1015-1022.

- Larrigaudière, C., Vilaplana, R., Soria, Y. y I. Recasens, 2004. Oxidative behaviour of “Blanquilla” pears treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. *J. Sci. Food Agric.* 84: 1871-1877.
- Lau L., 1993. Scald and its control: The North American Situation. *Acta Hort.* 326: 225-230.
- Lentheric I., Pinto E., Vendrell M. y C. Larrigaudiere, 1999. Harvest date affectis the antioxidative systems in pear fruits. *J. Hortic. Sci & Biotec.* 74: 791-795.
- Li X. Wang T., Zhou B., Gao W., Cao J y L. Huang, 2014. Chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory potential of peles and from 10 different pear varieties (*Pyrus* spp.) *Food Chemistry.* 152: 531-538.
- Lin, L. y J. Harnly, 2008. Phenolic compounds and chromatographic profiles of pear skins (*Pyrus* spp.). *J. Agri. Food Chem.* 56 (19): 9094-9101.
- Little, C. y H. Taylor, 1981. Orchard locality and storage factors affecting the comercial quality of Australian Granny Smith apples. *J. Hortic. Sci.* 56: 323-329.
- Little, C y E. Holmes, 2000. *Storage Technology for Apples and Pears: A guide to production, Postharvest Treatment and Storage of Pome Fruit in Australia*, 528pp.
- Lyons JM, 1973. Chilling injury in plants. *Annual Rev. Plant* 24: 445-466.
- Lynch DV y PL. Steponkus, 1987. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of Winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *PlantPhysiol* 83: 761-767.
- Lurie S., Lers A., Shacham Z., Sonogo L., Burd S. y R. Whitaker, 2005. Expression of α -farnesene synthetase AFS1 and 3-hydroxy-3-methylglutary-coenzyme a reductase HMG2 and HMG3 in relation to α -farnesene and conjugated trienols in ‘Granny Smith’ apples heat or 1-MCP treated to prevent superficial scald. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130: 305-310.
- Lurie S., y C. Watkins, 2012. Superficial scald, its etiology and control. *Postharvest Biol. Tec.* 65: 44–60.
- Mathew, A. y H. Parpia, 1971. Food browning as a polyphenol reaction. In *Advances in food research* (Vol. 19, pp. 75-145). Academic Press.
- Meir, S. y W. Bramlage, 1988. Antioxidant activity in “Cortland” apple peel and susceptibility to superficial scald after storage. *J. Am. Soc. Horti. Sci.* . 113: 412-418.
- Merritt R., Stiles W., Havens A. y L. Mitterling, 1961. Effects of Preharvest air temperatures on storage scald of Stayman apples. *Proc.Am. Soc. Hortic. Sci.* 78:24-34.

Mir N., Pérez R. y R. Beaudry, 1999. A poststorage burst of 6-methyl-5-hepten-2-one (MHO) may be related to superficial scald development in 'Cortland' apples. *J. Amer. Soc. Horti. Sci.* 124:173-176.

Moggia, C. 2002. Escaldado en manzanas. Centro de Pomáceas. Boletín técnico, 2, 1-4.

Moggia, C., Pereira, M., Yuri, J., y M. Moya, 2005. Pre and post-harvest maturity evolution and storage potential of Packham'sTriumph pears. *Agricultura técnica (Chile)*.65: 246-257.

Moggia C., Moya-León A., Pereira M, Yuri J. y G. Lobos, 2010. Effect of DPA and 1-MCP on chemical compounds related to superficial scald of Granny Smith apples. *Spanish J. Agric. Res.* 8 (1): 178-187.

Moreau, R. A., Whitaker, B. D. y K. Hicks, 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in lipid research.* 41(6), 457-500.

Nigel G., Jinhe BH. y B. Whitaker, 2006. Inhibition of ethylene-induce a-farnesene synthase gene PcAFSI expression in 'd'Anjou' pears with 1-MCP reduces synthesis and oxidation of a-farnesene and delays development of superficial scald. *Postharvest Biol. Tec.* 41: 225-233.

Nortje, B. y B. Koeppen, 1965. The flavonol glycosides in the fruit of *Pyrus communis* L. cultivar Bon Chrétien. *Biochemical Journal.* 97(1): 209-213.

Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). 2018. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. (en línea). Recuperado de <http://www.odepa.gob.cl>. Consultado: 26febrero de 2019.

Ozturk A., Demirsoy L., Demirsoy H., Asan A. y O. Gül, 2015. Phenolic Compounds and Chemical characteristics of pears (*Pyrus Communis* L.). *International Journal of food Properties.* 18:536-546.

Patterson M. 1993. Harvest and CA Storage Regime for Arresting Scald in Granny Smith Apples. Washington State University. *Tree Fruit Postharvest Journal.* 4(2): 58-62.

- Pechous W., Watkins Ch. y B. Whitaker, 2005. Expression of α -farnesene synthase gene AFS1 in relation to levels of α -farnesene and conjugated trienols in peel tissue of scald-susceptible “Law Rome” and scald-resistant “Idare” apple fruit. *Postharvest Biol. Tec.* 35: 125-132.
- Pesis E., Ibañez A., Phu M., Mitcham E., Ebeler S. y A. Dandekar. 2009. Superficial scald and Bitter pit development in Cold-stored transgenic apples suppressed for ethylene biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 57: 2786-2792.
- Piretti M., Gallenari G. y U. Brodnik, 1996. Polyphenol polymerization involvement in apple superficial scald. *Postharvest biol. Tec.* 8: 11-18.
- Quiñones, M., Miguel, M., y A. Alexandre, 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria.* 27(1): 76-89.
- Raison JK y GR., Orr, 1990. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. C.Y. Wang (ed) *Chilling Injury of Horticultural Crops.* CRC Press, Boca Raton FL: 145-164.
- Ranadive, A., y N. Haard, 1971. Changes in polyphenolics on ripening of selected pear varieties. *J. Sci. Food Agric.* 22(2): 86-89.
- Roberts, E. y D. Wood, 1951. A study of the polyphenols in tea leaf by paper chromatography. *Biochemical Journal*, 49 (4): 414.
- Roberts, E. y D. Wood, 1950. Fermentation process of tea manufacture. 11. Oxidation of substrates by tea oxidase. *Biochem.* 1(47): 175.
- Robards K., Prenzler P., Tucker G., Swatsitang P. y W. Glover, 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry.* 66: 401-436.
- Rudell D. and J. Mattheis, 2009. Superficial scald development and related metabolism is modified by postharvest light irradiation. *Postharvest Biol. Tec.* 51: 174–182.
- Rudell D., Mattheis, J. y M. Hertog, 2009. Metabolomic change precedes apple superficial scald symptoms. *J. Agric. Food Chem.* 57: 8459–8466.
- Rudell D., Buchanan D., Leisso R., Whitaker B., Mattheis j., Zhu Y. and V. Varanasi, 2011. Ripening, storage temperatura, ethylene action, and oxidative stress alter Apple peel phytosterol metabolism. *Phytochemistry.* 72: 1328-1340.
- Rupasinghe H., Paliyath G. y D. Murr, 2000. Sesquiterpene α -farnesenesynthase: partial purification, characterisation, and activity in relation to superficial scald development in apples. *J. Am. Soc. Horti. Sci.* 125(I): 111-119.

- Sabehat A, Lurie S y D. Weiss, 1998. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injuries. *PlantPhysiol.* 117: 651-658.
- Sánchez C., Larrauri J. y F Saura, 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76: 270-276.
- Saltveit, M. y L. Morris, 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops. *Chilling injury of horticultural crops*, 3-15.
- Schieber, A., Keller, P., y R. Carle, 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910(2): 265-273.
- Schuler I., Milon A., Nakatani Y., Ourisson G., Albrecht A. Benveniste P. y M. Hartmann, 1991. Differential effects of plant sterols on water permeability and on acylchain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Biophysics, Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 88: 6926-6930.
- Song J., Gardner B, Holland J. and R. Beaudry, 1997. Rapid analysis of volatile flavor compounds in apple fruit using SPME and GC/ time-of-flight mass spectrometry. *J. Agri. Food Chem.* 45: 1801–1807.
- Someya S., Yoshiki Y. y K. Okubo, 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chemistry.* 79: 315-354.
- Soria Y. y I. Recarens, 1997. El escaldado superficial de la manzana. *Separata ITEA. Información técnica económica agraria.* 93: 49-64.
- Stanley C., Tustin D., Lupton G., McArtne S., Cashmore W. and H. de Silva, 2000. Towards understanding the role of temperature in apple fruit growth responses in three geographic regions within New Zealand. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75: 413-422.
- Steponkus PL, 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 543-584.
- Takeo, T. 1965. Tea Leaf Polyphenol Oxidase: Part I. Solubilization and Properties of the Structurally Bound Polyphenol Oxidase in Tea Leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, 29(6): 558-563.
- Thomai T., Sfakiotakis E., Diamantidis G. y M. Vasilakakis, 1998. Effects of low preharvest temperature on scald susceptibility and biochemical changes in ‘Granny Smith’ apple peel. A review. *Scientia Horticulturae.* 76: 1-15.
- Thomashow MF. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology* 118(1): 1-8.

Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., y H. Zhu, 2003. Polyphenolic profiles in eight Apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. food Chem.* 51(21): 6347-6353.

Tsimogiannis D. y V. Oreopoulou, 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative food Science and Emerging technology.*7: 140-146.

Whitaker B., Solomos T. and D. Harrison, 1997. Quantification of α -farnesene and its conjugated trienol oxidation products from apple peel by C18-HPLC with UV detection. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 760–765.

Whitaker B., 1998. Phenolic fatty-acid esters from the peel of 'Gala' apples and their possible role in resistance to superficial scald. *Postharvest Biol. Tec.* 13: 1–10.

Whitaker B., Nock J. y C. Watkins, 2000. Peel tissue α -farnesene and conjugated trienols concentrations during storage of 'White Angel' \times 'Rome Beauty' hybrid apple selections susceptible and resistant to superficial scald. *Postharvest Biol. Tec.* 20: 231-241.

Whitaker B., 2004. Oxidative stress and apple scald. *Hortscience.* 39: 924-929.

Whitaker B., 2007. Oxidation products of alpha-farnesene associated with superficial scald development in D'Anjou pear fruits are conjugated trienols. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3708–3712.

Whitaker B., Villalobos-Acuña M., Mitcham E. y J. Mattheis, 2009. Superficial scald susceptibility and α -farnesene metabolism in 'Bartlett' pears grown in California and Washington. *Postharvest Biol. Tec.* 53: 43–50.

Warrington I., Fulton T., Halligan E. and H. de Silva, 1999. Apple fruit growth and maturity are affected by early season temperatures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 468-477.

Watkins C., 1993. Preharvest factors affecting superficial scald. *Washington State University Tree fruit postharvest Journal.* 4(2): 16-22.

Watkins Ch., Bramlage W. y B. Cregoe, 1995. Superficial scald of Granny Smith apples is expressed as a typical chilling injury. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(1): 88-94.

Watkins, C., 2003. Principles and practices of posthaverst handling and stress. In D. C. Ferree& I. J. Warrington (Eds.), *Apple: Botany, production and uses* (pp. 585-614). Wallingford: CAB International.

World fresh pear forecast, 2017. <https://www.freshplaza.com/article/168877/World-fresh-pear-forecast-2016-2017>.

Xie X., Song J., Wang Y. and D. Sugar, 2014. Ethylene synthesis, ripening capacity, and superficial scald inhibition in 1-MCP treated 'd'Anjou' pears affected by storage by storage temperatura. *Postharvest Biol. Tec.* 97:1-10.

Yoshida Y. y E. Niki, 2003. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 49: 277-280.

Yu L., Jeong-Yong C., Chan-Mi K., Sang-Hyun L., Wol-Soo K., Tae-II J., Keun-Hyung P. y M. Jae-Hak, 2013. Coumaroyl Quinic Acid Derivatives and Flavonoids from Immature Pear (*Pyruspyrifolia*Nakai) Fruit. *Food Sci. Biotechnol.* 3: 803-810.

Zhao J., Xie X., Shen X. y Y. Wang, 2016. Effect of sunlight-exposure on antioxidants and antioxidant enzyme activities in D'Anjou pear in relation to superficial scald development. *Food Chemistry.* 210:18-25.

Zoffoli P., Richardson D., Chen P. y D. Sugar, 1998. Spectrophotometric characterization of superficial and senescent scald in pear fruits relative to different stages of maturity. *Acta Hort.* 475. ISHS: 543-558.

Anexo 1. Promedios de los niveles de compuestos de peras cv. Packham's Triumph extraídos al momento de cosecha procedente de tres cosechas y 4 huertos durante la temporada 2017-2018.

α -farneseno (nmol·cm ⁻²)	Capacidad Antioxidante (OD · 1000 cm ⁻²)	Tc258 (nmol· cm ⁻²)	Tc269 (nmol· cm ⁻²)	Tc281 (nmol· cm ⁻²)	
109,9 ± 30,2	21,5± 8,1	10,1± 6,6	7,1 ± 5,0	1,9 ± 0,8	
MHO (η g ·g PF ⁻¹)	MHOL (η g · g PF ⁻¹)	(E,E)- α - farneseno (η g ·g PF ⁻¹)	Campesterol (ng ·100g PF ⁻¹)	beta-sitosterol (ng ·100g PF ⁻¹)	
0,1±0,04	0,2±0,06	0,4± 0,03	517,4± 287,6	651,5 ±262,1	
6-di-eter butil 4 sec butilfenol (Abu.Rel.)	n-butyl acetato (Abu.Rel.)	α -copaeno (Abu.Rel.)	Etil-trans-cis-2,4 decadienoato (Abu.Rel.)	Hidroxido de butilo (Abu.Rel.)	
61648,5± 50458	998,2± 517,8	8801,3±4388,6	1593,6±461,3	88296,4±51538	
Éster de tetradecilo de butilo (Abu.Rel.)	Éster hept-4-il de butilo (Abu.Rel.)	(Z,E)- α - farneseno (Abu.Rel.)	Cadina-1 (10) (Abu.Rel.)	Acetato de Hexilo (Abu.Rel.)	
391,5± 205,3	445,1±271,0	45452±17712	48774,8±19051,5	660,5±269,3	
Cianidina (ng g PF ⁻¹)	Ácido Hidrocinámico (ng · g PF ⁻¹)	Daidzeina (ng·g PF ⁻¹)	Ácido caféico (ng · g PF ⁻¹)	Idaeina (ng· g PF ⁻¹)	Ácido gálico (ng·g PF ⁻¹)
0,7±0,194	0,1±0,03	0,1±0,01	0,3±0,22	0,1±0,104	4,9±4,6
Catequina (ng · g PF ⁻¹)	Quercitina (ng g PF ⁻¹)	Apigenina (ng· g PF ⁻¹)	Isorhamnetin a-3-O- glucosido (ng· g PF ⁻¹)	Isorhamnetina-3- O-rutinosido (ng · g PF ⁻¹)	Procianidina A2 (ng · g PF ⁻¹)
0,3±0,33	0,1±0,01	0,6±0,55	0,1±0,01	0,4±0,22	0,1±0,013
Epigalo- catequina (ng · g PF ⁻¹)	Quercitrina (ng ·g PF ⁻¹)	Apigenina7- O-glucoside (ng· gPF ⁻¹)	Rutina (ng ·g PF ⁻¹)	Epigalocatequina de galato (ng· gPF ⁻¹)	Epicatequina (ng · g PF ⁻¹)
0,1±0,013	0,1±0,07	0,0±0,014	0,1±0,055	0,2± 0,57	0,1±0,032