



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**“Evaluación de la tecnología de plasma frío atmosférico sobre la calidad de manzanas
cv. Cripps Pink”**

MEMORIA DE TITULO

JAVIER IGNACIO ALVARADO SAN FELIÚ

**PROFESOR GUÍA: GONZALO DÍAZ ULLOA
PROFESOR NFORMANTE: ANÍBAL CONCHA MEYER**

TALCA, 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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi madre por ser una de las personas más importantes en mi vida y a quién admiro, sé que sin ella todo lo que soy y he logrado hasta el día de hoy no podría haber sido factible. Agradecerle por eso, por todo lo que me ha brindado estos 25 años que para mí ha sido fundamental. Agradecerle también a mi familia, que de alguna u otra manera siempre me han apoyado en todos mis proyectos, a mi papá, hermanos e Iván. A Florencia, mi polola. A mis amigos, que son incondicionales, y son también parte de mi familia.

Sin lugar a duda, agradezco a mis profesores quienes estuvieron en toda mi etapa universitaria, como también a aquellos que estuvieron en este proceso final.

En especial quiero reconocer y agradecer a los profesores Carolina Torres y Anibal Concha, a la investigadora Gloria Sepúlveda, y a los ayudantes del laboratorio de postcosecha (Centro de Pomáceas 2018-2019), por su apoyo y colaboración en lograr con éxito mi trabajo experimental y elaborar el escrito. Finalmente agradezco al profesor Gonzalo A. Díaz por sus consejos y apoyo en la parte final del escrito de mi tesis.

RESUMEN

El manzano (*Malus x domestica* Borkh.) es una de las especies frutales más importantes en Chile, con una superficie de 32.371 ha, concentrándose entre las regiones de O'Higgins y del Maule con un 20% y 60%, respectivamente. En este sentido, la manzana del cultivar Cripps Pink es una de las más cotizadas a nivel mundial. El almacenaje en frío convencional o en atmósfera (controlada o modificada) es la forma de conservar los frutos en calidad y así alcanzar mejores precios en los destinos. Hoy en día el plasma, conocido como el cuarto estado de la materia, es una tecnología relativamente nueva en el área de los alimentos, la cual busca mejorar las condiciones de conservación y también que los frutos mantengan una alta calidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de plasma frío atmosférico (PFA) en 90 días de almacenaje en manzanas cv. Cripps Pink que fueron recolectadas en Romeral, Región del Maule. El equipo de PFA fue utilizado con una potencia 1.500 W, voltaje de 15 kV, corriente de 5 Amp y un flujo de aire de 10 L/min. Se trataron 20 frutos para índice de madurez a cosecha, y después de 90 días de almacenamiento a 4°C con 90% de humedad relativa. El tratamiento de PFA se aplicó durante 30 s a una distancia de 5 cm desde el electrodo hasta la superficie del fruto. A las manzanas se le evaluaron los índices de madurez, peso (g), índice de diferencia de absorbancia (I_{AD}), sólidos solubles (°Brix), firmeza (lb), almidón (escala 1-10), color de fondo (escala 1-4) y color de cubrimiento (%). Además, se evaluó la condición de las manzanas después de los tratamientos, observando posibles daños o enfermedades y finalmente, se evaluó el perfil fenólico (flavonoides) a través de cromatografía líquida de ultra alta presión con detector de masas (UHPLC-MS) Thermo Dionex Ultimate 3000. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron conocer relevantes resultados respecto a la aplicación de PFA sobre el cv. Cripps Pink en cuanto a su calidad, condición y perfil fenólico luego de 90 días en almacenaje. Sin embargo, es necesario que se investigue más sobre esta tecnología de postcosecha, debido a su gran potencial.

Palabras claves: Cripps Pink, índice de madurez, perfil fenólico, plasma frío

ABSTRACT

The apple tree (*Malus x domestica* Borkh.) is one of the most important fruit species in Chile, with an area of 32,371 ha, located between O'Higgins and Maule regions with 20% and 60%, respectively. In this sense, cultivating cv. Cripps Pink apples is one of the most profitable worldwide. Conventional cold storage or controlled/modified atmosphere is the way to preserve the fruits and achieve better prices in the destinations. Today plasma technology, known as the fourth state of matter, is relatively new in food applications, which seeks to improve storage conditions, and maintain fruit high quality. The objective of this work was to evaluate the application of cold atmospheric plasma (CAP) in 90 days in storage in apples cv. Cripps Pink that were collected in Romeral, Maule Region. The CAP equipment was used with a 1,500W power, 15 kV voltage, 5 Amp current and an air flow of 10 L / min. Twenty fruits were treated for maturity index, in harvest and after being stored for 90 days, PFA was applied for each treatment for 30 s at distance of 5 cm from the electrode to the surface of the fruit. In addition, the condition of the apples was evaluated after the treatments, observing possible damages or diseases and finally, the phenolic profile (flavonoids) was evaluated using an ultrahigh performance liquid chromatography with mass spectrometry detector equipment (UHPLC-MS) Thermo Dionex Ultimate 3000. The results requested in this paper allowed us to know the relevant results regarding the application of PFA on cv. Cripps Pink in terms of quality, condition and phenolic profile after 90 days in storage. However, more research is needed on this postharvest technology, due to its great potential.

Keywords: Atmospheric cold plasma, Cripps Pink, maturity indexes, phenolic profile.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivo general	2
1.3 Objetivos específicos	2
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1 Producción de manzana	3
2.1.1 Producción de la manzana en Chile	3
2.1.2 Exportación nacional	4
2.2 Salud	4
2.2.1 Antioxidantes	4
2.3 Problemas y alteraciones en postcosecha de la manzana	5
2.3.1 Desórdenes o alteraciones fisiológicas	5
2.3.2 Enfermedades de postcosecha	6
2.4 Tecnologías de postcosecha	6
2.5 Plasma frío atmosférico (PFA)	8
2.6 Efectos del PFA en inocuidad y calidad de alimentos	8
3. MATERIALES Y METODOS.....	10
3.1 Ubicación del estudio	10
3.2 Material vegetal	10
3.3 Tratamientos de Plasma frío atmosférico (PFA) sobre manzanas cv. Cripps Pink .	10
3.4 Evaluaciones	11
3.4.1 Efecto del PFA sobre índices de madurez de manzanas cv. Cripps Pink	11
3.4.2 Efecto del PFA en el control de Ojo de Buey en manzanas cv. Cripps Pink, almacenadas por 90 días	11
3.4.3 Efecto del PFA sobre el perfil fenólico de manzanas cv. Cripps Pink	12
3.5 Diseño experimental y análisis estadístico	14
4. RESULTADOS Y DISCUSION	15
4.1 Efecto del PFA sobre índices de madurez de manzanas cv. Cripps Pink	15

4.2 Efecto del PFA en el control de Ojo de Buey en manzanas cv. Cripps Pink, almacenadas por 90 días	18
4.3 Perfil fenólico	20
6. CONCLUSION.....	23
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	24

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 2.1. Superficie y producción de manzanas en Chile entre 2004 y 2012.....	3
Cuadro 2.2. Condiciones óptimas para el almacenaje de manzanas cv. Cripps Pink.....	7
Cuadro 3.1. Tratamientos de plasma frío atmosférico (PFA) en manzanas cv. Cripps Pink bajo estudio.....	11
Cuadro 3.2. Descripción de cada tratamiento para la determinación del perfil fenólico de las manzanas cv. Cripps Pink.....	12
Cuadro 3.3. Flavonoides (Catequina, cloruro de cianidina, rutina, hiperósido, apigenina 7-O glucósido, quercitirina, epicatequina, ácido 4-cumarico, procianidina A2, quercitina) que se buscó identificar en piel de manzanas cv. Cripps Pink.....	14
Cuadro 4.1. Promedios de índice de madurez de manzanas cv. Cripps Pink para control a cosecha.....	15
Cuadro 4.2. Índices de madurez (promedios y desviación estandar) de manzanas cv. Cripps Pink sometidos a tratamientos de plasma frío atmosférico (PFA) después de 90 días de almacenaje a 4°C.	16
Cuadro 4.3. Promedios y desv. estándar de la concentración (ng/gPF) de flavonoides obtenidos a través de la cromatografía líquida del análisis de la piel desde manzanas cv. Cripps Pink para frutos sin exposición a plasma (tratamiento control), PFA-90 (aplicación de plasma a los 90 días) y PFA-0-90 (aplicación de plasma a cosecha y a 90 días).....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 3.1. Aplicación de plasma frío atmosférico (PFA) a manzanas cv. Cripps Pink.....	10
Figura 3.2. Detector de masas (UHPLC-MS) Thermo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA)	13
Figura 4.1. Síntomas de Ojo de Buey en manzanas cv. Cripps pink sin exposición al tratamiento de plasma (tratamiento control), después de 90 días de almacenamiento.....	19
Figura 4.2. Porcentaje de manzana cv. Cripps Pink con síntomas de Ojo de Buey después de los tratamientos con plasma frío atmosférico (PFA) de manzanas cv. Cripps Pink, almacenadas por 90 días.....	20
Figura 4.3. Efecto de la aplicación de plasma sobre las moléculas catequina, epicatequina, quercitina y ácido 4-cumárico respecto al control con diferencias de 7 días.....	21

1. INTRODUCCION

El manzano doméstico *Malus x domestica* Borkh., es ampliamente plantado en todo el mundo, llegando a 4,92 millones de hectáreas según la FAO en el 2009 (ODEPA, 2011). Según ODEPA (2019), Chile alcanzó las 26.746 ha plantadas de variedades de manzana roja y 5.634 ha de variedades de manzana verde, sumando entre las dos variedades un total de 32.370 ha de esta especie. En el 2018 se generó un volumen de exportación de 775.000 ton, siendo Estados Unidos, el principal destino de las exportaciones de fruta fresca (ODEPA, 2019). Es importante señalar que la variedad Cripps Pink es usada para la marca de manzana 'Pink Lady™', aquella fruta que cumple con ciertos requisitos de calidad (Fresno et al., 2014). Por lo tanto, al hablar de Cripps Pink también hablamos de la variedad Pink Lady.

Por su alto contenido de sales minerales y vitaminas, la manzana es considerada un alimento importante en la dieta humana ya que podría reducir los riesgos de padecer ciertas enfermedades, como algunos tipos de cáncer, problemas cardíacos, asma y diabetes debido a su contenido de compuestos químicos. Las pruebas de laboratorio indicaron que el consumo de manzana inhibió la expansión de las células cancerígenas y redujo la oxidación lipídica y los niveles de colesterol (Leontowicz et al., 2002). En segundo lugar, luego del arándano, la manzana tiene las actividades antioxidantes más altas (Boyer y Liu, 2004).

A nivel de alteraciones de postcosecha en manzanas, su gran limitante para almacenajes prolongados es la ocurrencia de pardeamiento interno, el cual se encuentra fuertemente asociado a la interacción de factores de pre y postcosecha, junto al estado fisiológico de los frutos al momento de la recolección (Fresno et al., 2014).

Para que la fruta fresca de calidad producida llegue en buenas condiciones a los distintos países de destino se realizan múltiples manejos y tratamientos antes de la cosecha y almacenamiento como la aplicación de calcio, antioxidante, retardadores de madurez, entre otros. Después en postcosecha, la selección y embalaje de la fruta se aplican fungicidas y ceras, además de medidas que favorezcan la inocuidad alimentaria. Dentro de las tecnologías, también es importante el preenfriamiento de la fruta (Silva et al., 2006). 'Cripps Pink' es una variedad que se almacena sin problemas a 1,5-2,0 kPa de O₂ y 1,0-3,0 kPa de CO₂, produciendo menores niveles de etileno al madurar después a 20°C, pero generándose pardeamiento a los 2 meses (De Castro et al., 2007).

Los tratamientos de postcosecha se combinan típicamente con un manejo apropiado de las temperaturas y atmósfera de almacenamiento. Dentro de las nuevas tecnologías emergentes de postcosecha en desarrollo, para asegurar la inocuidad alimentaria y extender la vida útil de la fruta, se encuentra el plasma frío atmosférico (Ramazzina et al., 2016). El plasma a menudo se conoce como el cuarto estado de la materia, de acuerdo con un aumento en el nivel de energía

de sólido a líquido, luego a gas, y finalmente a un estado ionizado del plasma de gas, el cual muestra propiedades únicas (Misra et al., 2016). En el pasado, el plasma frío fue usado para la esterilización de materiales sensibles y ahora, ha sido extendido a la industria alimentaria como una novedosa tecnología (Thirumdas et al., 2015). Durante muchos años, el procesamiento por plasma frío era visto como útil para la inactivación microbiana de productos frescos manteniendo su inocuidad y calidad.

Dentro del mundo de alimentos procesados, existen normas las cuales los productores deben regirse voluntariamente para comercializar sus productos, tales como GLOBALGAP. Estas normas fueron instaladas para que los consumidores tengan claro cómo se producen los alimentos en los campos, acentuado la seguridad alimentaria, salud y bienestar de los trabajadores que participan en los procesos de producción, los aspectos ambientales y el bienestar animal (Mietto, 2010). En la actualidad, Estados Unidos es el principal país de destino de manzanas en Chile, por lo que es necesario tener en cuenta sus normas FSMA (Food Safety Modernization Act), las cuales son un conjunto de varias normas que se aplican en distintas etapas de la cadena productiva en todas las instalaciones que produzcan y despachen alimentos a los Estados Unidos (Adonis, 2016). Por ende, el uso de tecnología que permitan conservar la calidad y la inocuidad alimentaria son fundamentales para poder comercializar productos en diferentes mercados.

A continuación, se plantea la hipótesis y objetivos del presente estudio:

1.1 Hipótesis

La aplicación de plasma frío atmosférico no altera la calidad de manzanas cv. Cripps Pink durante postcosecha.

1.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de plasma frío atmosférico en la calidad de manzanas cv. Cripps Pink como tratamiento de postcosecha.

1.3 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la exposición a plasma frío atmosférico sobre parámetros de calidad de manzanas cv. Cripps Pink.
- Determinar el efecto de la exposición a plasma frío atmosférico sobre el control de Ojo de Buey durante almacenaje de manzanas cv. Cripps Pink.
- Determinar el efecto de la exposición a plasma frío atmosférico sobre el perfil fenólico de manzanas cv. Cripps Pink.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Producción de manzana

El manzano (*Malus x domestica* Borkh.) es una especie frutal de mayor difusión a nivel mundial, lo cual tiene que ver con su fácil adaptación a diferentes zonas edafoclimáticas (Gil, 2012; Sutton et al., 2014). En la actualidad, China es el país que tiene la mayor superficie plantada con 2.410.000 hectáreas a nivel mundial, equivalente al 46% del total de la superficie mundial.

El comercio de la manzana tuvo un alza cercana al 10% entre los años 2008 y 2012, alcanzando al final de la última temporada un volumen de alrededor de 8,2 millones de toneladas (ODEPA, 2013). La producción mundial de manzanas alcanzaría cerca de 80 millones de toneladas, de las cuales China ocupa más de un 49%.

China es el país de mayor exportación a nivel mundial de manzanas frescas, respecto a su volumen exportado, el cual está cercano al millón de toneladas, generando una participación del 12,8% en las exportaciones mundiales, luego está Polonia con un 12,4%, e Italia con un 12,3% (ODEPA, 2013).

2.1.1 Producción de la manzana en Chile

El país entre los años 2000 y 2012 no aumentó significativamente la superficie de manzanos por hectárea, sin embargo, la producción ha aumentado su valor a casi el doble, con un 5,4% de tasa de crecimiento anual. Esto se debe principalmente a un manejo eficiente de los huertos frutales, introducción de nuevas variedades con mejor producción entre otros factores (CIREN, 2015).

Cuadro 2.1. Superficie y producción de manzanas entre los años 2004 y 2012 en Chile.

AÑO	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Superficie (ha)	36.095	34.820	35.247	34.963	34.963	35.075	35.029	35.682	36.579
Producción (ton)	1.250.000	1.300.000	1.471.858	1.507.843	1.504.101	1.330.617	1.624.242	1.588.347	1.507.182

Fuente: Bravo, 2013.

En Chile, el manzano se cultiva entre las regiones Metropolitana y de Los Lagos, pero las más importantes en cuanto a la superficie y producción son las regiones del Libertador General Bernardo O'Higgins, del Maule, del Bío-Bío y de La Araucanía. En el año 2019, la Región del

Maule es la que tiene la mayor superficie plantada de manzanos con 16.870 ha, seguido por la Región de O'Higgins con 5.368 ha, y la Región de La Araucanía con 2.845 ha (ODEPA, 2019).

Según ODEPA (2019), Chile alcanzó las 26.746 ha de variedades de manzana roja y 5.634 ha de manzana verde, dando un total de 32.380 ha de manzanas.

2.1.2 Exportación nacional

Desde el punto de vista de las exportaciones, en el 2017 se generó un volumen de exportación de 870.050 ton, siendo Estados Unidos el principal destino de las exportaciones de fruta fresca (ODEPA, 2018). Sin embargo, en el siguiente año (2018), la exportación tuvo una pequeña baja, ya que solo se registró una exportación de 775.000 ton (ODEPA, 2019). Desde el 2013, los Países Bajos han tenido un aumento significativo en su participación como destino de manzanas chilenas, ubicándose en el segundo lugar de mayor importancia (Bravo, 2013). Según la tendencia de las exportaciones de manzana chilena, se logra visualizar, que en los últimos años van en aumento las exportaciones hacia países desarrollados, al igual que algunos países emergentes. Aunque países latinoamericanos han bajado su participación como Colombia y Ecuador (Bravo, 2013).

2.2 Salud

Hace algunos años, consumir alimentos más saludables se ha convertido en una prioridad para los humanos (Pirlak et al., 2017). Las uvas, entre algunas frutas, juega un rol fundamental debido a su alto contenido de flavonoides, y ácidos fenólicos, por lo tanto, son una potente fuente anticancerígena y de antioxidantes. La manzana es bastante parecida, contiene sales minerales y vitaminas, por lo que es útil para reducir riesgos de ciertas enfermedades como cáncer, problemas cardíacos, asma, entre otras, debido a su alto contenido de compuestos químicos beneficiosos (Pirlak et al., 2017). Algunos estudios relacionan el consumo de la manzana con la reducción del riesgo a desarrollar enfermedades crónicas, como el cáncer de pulmón en mujeres (Boyer y Liu, 2004).

2.2.1 Antioxidantes

Los antioxidantes naturales fundamentales que están presentes en los alimentos y que protegen al cuerpo humano de los radicales libres son vitaminas (A, C y E), flavonoides, carotenoides y polifenoles (Pirlak et al., 2017). Los antioxidantes eliminan las moléculas denominadas "radicales libres" que ocurren en el cuerpo humano después de actividades metabólicas. Si hay una sobre producción de radicales libres en el tiempo, estos generan un efecto negativo sobre nuestras células y tejidos (pérdida de la integridad de las membranas y

funcionalidad), pudiendo producir cáncer. Los antioxidantes no solo son producidos por células del cuerpo, sino que también se adquieren a través de los alimentos (Pirlak et al., 2017).

La capacidad antioxidante de los polifenoles de las manzanas es una de las más altas dentro de las frutas y verduras comúnmente consumidas (Lee et al., 2003; Sun et al., 2002). Los principales tipos de polifenoles descritos en las manzanas son los flavonoides, tales como los flavonoles (quercitina y glucósidos de la quercitina), flavanoles (epicatequina, catequina y sus oligómeros, procianidinas), antocianinas, dihidrocalconas que solo se encuentran en las manzanas (floridzina y floretina) y otros compuestos fenólicos, como el ácido clorogénico (Alonso-Salces et al., 2004).

2.3 Problemas y alteraciones en postcosecha de la manzana

La producción de fruta en reiteradas oportunidades está expuesta a pérdidas asociadas principalmente por los desórdenes fisiológicos y enfermedades fungosas que se expresan durante almacenaje de las manzanas.

2.3.1 Desórdenes o alteraciones fisiológicas

Posterior a la cosecha, las manzanas pueden presentar numerosos daños físicos o desórdenes fisiológicos que pueden perjudicar su comercialización, siendo causados durante la precosecha, cosecha, transporte y almacenaje.

Las magulladuras o machucones pueden ser relevantes, llegando a niveles del 64 a 90% antes de llegar a los mercados de destino (Dewey y Schueneman, 1971; Bartram et al., 1983; Cappellini et al., 1987). Según el estudio de Brown et al., (1993), de los machucones en manzanas de más de 6,0 mm (14%), dónde más se produce este tipo de daño es en la línea de procesamiento, con el 6%. El cultivar Pink Lady es sensible a este tipo de daño, al ser de mayor calibre (Gil, 2012).

La quemadura por radiación solar es otro problema en manzanas, lo cual ocurre cuando la superficie de la fruta está expuesta a la radiación solar, llegando a los 31°C, produciendo un foto blanqueamiento, que posiblemente se vea color marrón (Schrader et al., 2019). Se ha visto que la fruta afectada tiene menor agua relativa y acidez total, más sólidos solubles y firmeza durante el período de postcosecha (Schrader et al., 2009).

Dentro de los problemas que se pueden ver en almacenaje de manzanas, podemos encontrar los desórdenes fisiológicos. El corazón acuoso o 'watercore', es un desorden que se caracteriza por un aspecto translúcido o vidrioso (vidriosidad) de zonas de la pulpa, alrededor de haces vasculares debido a la acumulación de sorbitol y sacarosa (azúcares) en los espacios intercelulares de los tejidos, o también en el corazón del fruto en donde se logra adquirir ese

aspecto, que en algunas manzanas se ve una radiación hacia la pulpa asimilando una estrella (Simons, 1968; Bowen y Watkins, 1997; Faust et al., 1969). En manzanas maduras con alto contenido de azúcares presentan mayor riesgo a desarrollar este desorden en los espacios intercelulares (Gil, 2012).

La depresión amarga o "bitter pit", es de los desórdenes más frecuentes de observar en los frutos asociados a la deficiencia de calcio, el cual tiene su origen en el huerto y que se manifiesta luego de un tiempo en almacenaje, generando grandes pérdidas en el mercado mundial de las manzanas (Faust y Shear, 1968; Ferguson y Watkins, 1989), como en Chile (Gil, 1993; Retamales et al., 1993). El desarrollo de este problema en las manzanas tiene directa relación con la deficiencia de calcio en los tejidos (Van Lune et al., 1979). Un déficit de calcio en los tejidos conlleva a tejidos más blandos, al carecer de una pared firme y generar el colapso de las células, desarrollando la mancha corchosa, bitter pit o depresión amarga (Gil, 2012).

2.3.2 Enfermedades de postcosecha

Dentro de las principales enfermedades fungosas de la manzana en Chile, se encuentran el moho azul, causada por *Penicillium expansum* y la pudrición calcinal causada por *Botrytis cinerea* (Latorre, 2018; Ferrada et al., 2016). Sin embargo, en la última década la enfermedad denominada 'Ojo de Buey' causada por el hongo *Neofabraea vagabunda* (= *N. alba*), ha producido pérdidas considerables y rechazos en mercados como China. El Ojo de Buey es una patología donde *N. vagabunda* infecta inicialmente a las lenticelas (en el huerto) y que posteriormente se puede expandir al resto de la superficie y de la pulpa, generando una pudrición blanda con patrones circulares (Latorre, 2018; Soto-Alvear et al., 2013). La pudrición Ojo de Buey solo se manifiesta o es visible después de al menos tres meses de almacenamiento a 0°C (Soto-Alvear et al., 2013).

2.4 Tecnologías de postcosecha

Los tratamientos que se le aplican a la fruta antes de su almacenaje van relacionados directamente con su calidad y condición para la exportación. Para poder lograr que durante el almacenaje no se deterioren las manzanas, es importante almacenar un producto de buena calidad, libre de residuos vegetales, enfriar lo antes posible y que tenga las aplicaciones oportunas contra enfermedades que se manifiestan en la postcosecha (Gil, 2012).

Entre los diversos productos, se destacan los tratamientos con cloruro de calcio, los cuales prolongan la vida de la manzana (Sharples y Johnson, 1977; Siddiqui y Bangerth, 1996) no sometida a atmósfera controlada (Ortiz et al., 2010a, b). A menudo, según su prevalencia o de riesgo de bitter pit, se realizan aplicaciones de calcio en pre y postcosecha para el control de esta enfermedad en los frutos (Retamales y Valdes, 2005).

La gran parte de las variedades de manzanas logran mantener sus características en atmósfera regular a 0°C o 1°C, o a -0,5°C o -1°C si el control de la temperatura en la cámara es más exacto, y 90-95% de humedad relativa (HR) (Gil, 2012). La atmósfera controlada permite una mayor conservación, pero cada variedad se comporta de diferente manera, especialmente con respecto al anhídrido carbónico (CO₂); necesario para variedades sensibles al frío (Blanpied, 1977; Meheriuk, 1993; Dille, 2010). En variedades intolerantes al CO₂, el nivel de este gas debe mantenerse por debajo de los niveles de O₂. Estudios han observado que el cv. Pink Lady se puede conservar en buenas condiciones con 1,5-2,0 kPa de O₂ y 1,0-3,0 kPa de CO₂, produciendo menos etileno al madurar después a 20°C, pero generando pardeamiento luego de dos meses (De Castro et al., 2007).

Cuadro 2.2. Condiciones óptimas para el almacenaje de manzanas cv. Cripps Pink.

O₂ (kPa)	1,5-2,0
CO₂ (kPa)	<1,0
Temperatura (°C)	0
Duración (meses)	9
Características	Sensible a CO ₂ , pardeamiento interno; alcohol con bajo O ₂

Fuente: Meheriuk, 1993; Kupferman, 1997a.

Otra tecnología que se ha utilizado en la conservación de las manzanas es la aflicción inicial por bajo oxígeno, pero ha sido aplicada en pequeña escala (Gil, 2012). Se logra al incorporar el nitrógeno para eliminar el oxígeno, generando anoxia por nitrógeno. El oxígeno ultra bajo ha dado buen resultado para el almacenaje de la variedad 'Delicious' con 1% de O₂ (Anderson, 1967). Esta condición de ultra bajo oxígeno debe realizarse rápidamente, a la vez con un rápido enfriamiento, de esta manera se evitaría algún daño en el sistema de sabor de la fruta y respiración anaeróbica con la formación de alcohol. No debe haber diferencias mayores a 0,5% y el CO₂ debe mantenerse a no más del 1% (Gil, 2012).

La condición de almacenamiento de la fruta en diferentes formas, permiten preservar la calidad por mayor tiempo. Entre las condiciones de almacenamiento destacan el almacenamiento de fruta en atmósfera controlada (AC, niveles más usados son de 2,5 a 3% de O₂ y 1 a 3% de CO₂), el nivel de CO₂ adecuado va a depender de la variedad (Kupferman, 1997). Y en niveles de ultra bajo de oxígeno (ULOS, niveles de no mayor que 0,5% de O₂), atmósfera controlada dinámica (ACD), y con aplicación de 1-MCP (bajo ciertas condiciones de madurez), se logran realizar controles con distintos grados de eficacia (Torres et al., 2012). La ionización del oxígeno en la atmósfera de la cámara de almacenamiento ha disminuido la producción de etileno, el ablandamiento y la deshidratación de manzanas, específicamente de la variedad 'Royal Gala' (Gil, 2012).

2.5 Plasma frío atmosférico (PFA)

El plasma frío es una tecnología de desinfección relativamente nueva en el campo del procesamiento de alimentos (Niemira y Sites, 2008). El plasma se puede emplear de varias formas, así como sometiendo un gas a un campo eléctrico (entre dos electrodos), ya sea de campo de corriente constante (campo de corriente continua) o alterna (generalmente campo de alta frecuencia), mediante la aplicación de energía en varias formas, incluyendo; campos térmicos, eléctricos, mencionado anteriormente, o magnéticos y frecuencias de radio o microondas, que aumentan la energía cinética de los electrones provocando un aumento del número de colisiones en los productos de plasma formadores de gas como electrones, iones, radicales y radiación de longitudes de onda variables, incluida la de los rangos de UV (Thirumdas et al., 2015).

El plasma frío puede tener un gran efecto en las células microbianas, lo cual se debe principalmente a los iones del plasma y las interacciones celulares, debido a que se generan especies reactivas con el uso de esta tecnología, asociados a efectos oxidativos directos a las superficies externas de las células microbianas expuestas al plasma (Thirumdas et al., 2015). Por ejemplo, en una investigación de frutillas tratadas con plasma en frío, determinaron una disminución en el recuento total de bacterias mesófilicas aeróbicas entre el 12-85%, y en el caso de levaduras y mohos, decayeron en un 44 y 95% respectivamente (Misra et al., 2014). La eficacia de la inactivación microbiana depende de la superficie de tratamiento del producto, dispositivo de plasma, composición del gas y modo de exposición (Thirumdas et al., 2015).

Esta activación puede ocurrir durante cualquiera de los pasos en el procesamiento, distribución y comercialización de alimentos (Segura-Ponce et al., 2018). Esta importancia de mantener la fruta fresca y en buenas condiciones hasta que llegue al consumidor es muy relevante, ya que según Guvstavsson et al. (2013) el mayor porcentaje del desperdicio de productos comestibles o frescos es al momento en que llega al consumidor final, o sea en supermercados, mercados o empresas distribuidoras, tanto en Norte América como en Oceanía. Sin embargo, en Sudamérica, el mayor porcentaje de pérdidas es al momento de la cosecha y almacenaje, a diferencia en los países desarrollados.

2.6 Efectos del PFA en inocuidad y calidad de alimentos.

Se ha observado que la inactivación de los microorganismos a través del plasma actúa de tal manera, que oxida continuamente componentes celulares importantes, como, por ejemplo, la membrana bacteriana, degradación de lípidos, proteínas y ADN, afectando al funcionamiento de las células microbianas y por ende causando la muerte (Han et al., 2015).

Los tratamientos con PFA pueden afectar no solo la parte microbiológica de los productos vegetales, sino que también la calidad de estos como, por ejemplo, la pérdida de peso, color, firmeza, pH, acidez, tasas de respiración, etc. (Misra et al., 2016). Para el caso del color, estos pueden cambiar dependiendo de varios factores en los alimentos tratados con plasma, como las condiciones del tratamiento, características del producto, por ejemplo, si son partes de la fruta o una fruta entera. Si es un producto sólido o líquido y finalmente, el almacenamiento, condiciones y duración (Misra et al., 2016).

En cuanto a los cambios de la textura en frutas, se relacionan en la mayoría de los casos con cambios en los polímeros de la pared celular (Oey et al., 2008). Algunos estudios informan que la fruta tratada con plasma retiene de manera considerable su firmeza. Por ejemplo, en frutillas la retención de la firmeza fue aceptable con un tratamiento de plasma después de 24 h en almacenamiento a 10°C (Misra et al., 2014c). Es importante mencionar también que, en la misma fruta, la firmeza fue mayor en un ambiente con nivel de oxígeno alto comparado con un nivel de nitrógeno alto (Misra et al., 2014b).

Los antioxidantes son las primeras moléculas que actúan como un mecanismo de defensa frente a otras moléculas que pueden dañar las células vegetales, por lo tanto, es muy importante conocer esta interacción, con el fin de evitar algún daño en los productos vegetales. El plasma genera varias moléculas reactivas, donde los flavonoides cumplen un rol fundamental para contrarrestar los posibles efectos de estas moléculas que provoca el plasma, debido a la actividad antioxidante de los flavonoides que pueden ayudar a proteger a las células de los efectos dañinos de las especies reactivas al oxígeno (ROS) (Misra et al., 2016).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del estudio

Este estudio se llevó a cabo, en las instalaciones del Centro de Pomáceas, específicamente, en el Laboratorio de Postcosecha, y en el Centro de Estudios de Alimentos Procesados (CEAP), ambos ubicados en la Universidad de Talca, Campus Lircay, Talca, Chile.

3.2 Material vegetal

Los frutos de manzanos cv. Cripps Pink fueron cosechados desde un huerto comercial 'Silos de Romeral', ubicado en Romeral, Región del Maule, Chile. Se realizó una selección del material vegetal, descartando aquellos frutos con desordenes fisiológicos, daño de sol, machucones y heridas, como de frutos enfermos (n= 600 manzanas).

3.3 Tratamientos de Plasma frío atmosférico (PFA) sobre manzanas cv. Cripps Pink

El equipo de PFA (Surface SAP 2, Brasil), fue utilizado con una potencia 1.500 W, voltaje de 15 kV, corriente de 5 amperios y un flujo de aire de 10 L/min. Cada fruto de manzana cv. Cripps Pink, se colocó bajo el equipo de PFA a una distancia de trabajo de 5 cm desde el electrodo hasta la epidermis de la manzana y entre electrodo de 15,5 cm (Fig. 3.1). La exposición al PFA fue de 30 s por lado. Las aplicaciones de PFA se realizaron según lo indicado en detalle en el Cuadro 3.1. Independiente del momento de la aplicación (inmediatamente después de la cosecha o después de 90 días de almacenaje), toda fruta se almacenó en una cámara refrigerada a 4°C con una humedad relativa entre un 90 y 95%. Se utilizó una misma cantidad de fruta, pero que no se expuso al PFA (tratamiento control).

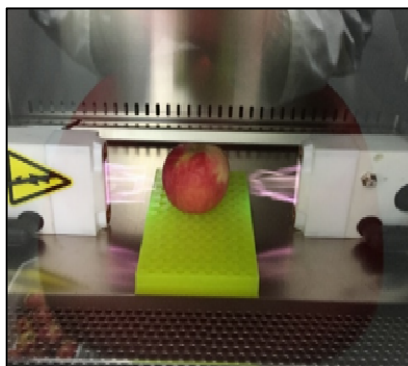


Figura 3.1. Manzana cv. Cripps Pink expuesta a la aplicación de plasma frío atmosférico (PFA).

Cuadro 3.1. Tratamientos de plasma frío atmosférico (PFA) en manzanas cv. Cripps Pink bajo estudio.

Tratamiento	Descripción
Control	Frutos almacenados a 4°C por 90 días sin exposición (tratamiento negativo).
PFA-90	Frutos almacenados a 4°C por 90 días, con exposición a plasma frío atmosférico después de 90 días de almacenaje.
PFA-0-90	Frutos tratados con plasma frío atmosférico a la cosecha (0 días) y después de 90 días de almacenamiento a 4°C.

3.4 Evaluaciones

3.4.1 Efecto del PFA sobre índices de madurez de manzanas cv. Cripps Pink

En este estudio, se evaluaron dos principales variables, calidad y porcentaje de pudriciones específicamente. Para la calidad se hicieron evaluaciones de índices de madurez para control y tratamiento (PFA-90 y PFA-0-90). Dentro de los índices de madurez se consideraron color de cubrimiento, color de fondo, peso (g), índice I_{ad} , sólidos solubles (°Brix), firmeza (lb) y almidón.

El peso se midió con una balanza digital. Para el nivel de clorofila en los frutos se utilizó un DA-meter (T.R. Turoni Srl, Bologna, Italia). El valor entregado es adimensional, expresado en unidades I_{ad} (0-3). Los sólidos solubles (°Brix) fueron evaluados a través de un refractómetro manual (Milwaukee MA871, España). La firmeza se midió con un presionómetro manual (Fruit tester analyzer, FTA, Guss GS-14, Australia), con un vástago de 9 mm de diámetro, arrojando unidades en libras (lb). Se retiró zona de piel de la zona ecuatorial del fruto, por cada cara opuesta. El almidón se observó a través de la aplicación de lugol (yoduro de potasio más cristales de yodo) a manzanas previamente cortadas transversalmente, comparando la tinción de las mitades, la cual tenía una escala de 1 a 10. Para la variable de calidad de color, se midió color de fondo y color de cubrimiento, para el color de fondo se realizó mediante una escala visual de 1 a 4, siendo 1 para el color verde, 2 para color verde-amarillo, 3 para amarillo-verde y 4 para color amarillo. Posteriormente, se midió el color de cubrimiento realizando una escala visual, la cual determina el porcentaje (%) de la manzana bicolor cv. Cripps Pink que está cubierto con color rojo.

3.4.2 Efecto del PFA en el control de Ojo de Buey en manzanas cv. Cripps Pink, almacenadas por 90 días

Con el propósito de determinar el efecto de la aplicación de plasma frío atmosférico (PFA) sobre la presencia de manzanas cv. Cripps Pink con síntomas de Ojo de Buey, toda fruta

sometida a los tratamientos con plasma (PFA-90 y PFA-0-90) incluyendo a las manzanas sin exposición al plasma, se evaluó el porcentaje de Ojo de Buey (Soto-Alvear et al., 2013).

3.4.3 Efecto del PFA sobre el perfil fenólico de manzanas cv. Cripps Pink

Para medir el perfil fenólico de los frutos de manzana, se tomaron muestras de piel desde seis frutos de manzanas no expuestas de plasma y manzanas expuestas a plasma (después de cosecha). Una vez obtenida la piel de las manzanas, se les realizó una congelación utilizando nitrógeno líquido (-194°C) para deshidratar las muestras, previo a su inyección al equipo de cromatografía. El cuadro 3.3 describe las muestras que se utilizaron en la obtención del perfil fenólico. Esta metodología se realizó para cada variable de tiempo.

Cuadro 3.2. Descripción de cada tratamiento para la determinación del perfil fenólico de las manzanas cv. Cripps Pink.

Tratamientos	Descripción
Control día 0 (C0)	Muestras al momento de cosecha congeladas el mismo día
Control día 7 (C7)	Muestras al momento de cosecha congeladas después de 7 días
Plasma día 0 (P0)	Muestras a cosecha con aplicación de PFA y congeladas el mismo día de aplicación
Plasma día 7 (P7)	Muestras a cosecha con aplicación de PFA y congeladas después de 7 días de la aplicación

Para la extracción de flavonoides se utilizó la técnica desarrollada por Rudell et al., (2009), fueron pesados 2.000 mg de piel de manzana y se adicionaron 5 mL de metanol (Merck, NJ, EE.UU.) al 75% y 100 µL de narginina (estándar interno, Sigma Aldrich, MO, EE.UU.). Luego se centrifugó (Prims R C2500, Labnet International, NJ, EE.UU.) durante 10 minutos a 2.000 xg y se extrajo el sobrenadante al cual se le adicionaron 20 mL de agua grado HPLC (Merck, NJ, EE.UU.). Al mismo tiempo se preparó una columna de extracción de fase sólida (SPE) Bon Elut C18 (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) hidratada con metanol al 75%. El sobrenadante obtenido se filtró por la columna SPE. Una vez obtenida la muestra, esta fue eludida con 2 mL de propanol grado técnico HPLC (Merck, NJ, EE.UU.). Posteriormente se secó la muestra utilizando nitrógeno líquido. Finalmente, la muestra fue reconstituida con 200 µL de metanol grado HPLC.

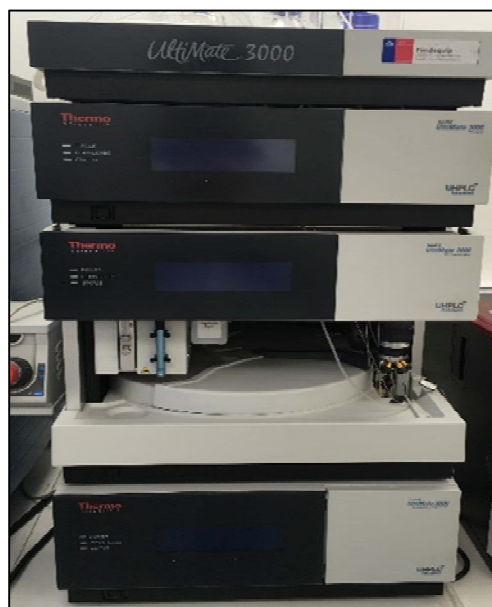


Figura 3.2. Cromatógrafo de UHPLC-MS Thermo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, EE.UU.).

Para la determinación de los flavonoides se utilizó un equipo de cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC-MS) Thermo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, EE.UU.) con columna Water C18 (Water Corp., MA, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) de alta resolución y masa exacta Exactive™ Plus Orbitrap (Thermo Scientific, MA, EE.UU.). La inyección de la muestra fue de 1 μL , en la fase móvil de 85% acetonitrilo con 5% ácido fórmico y agua (A) y 85% metanol y 5% ácido fórmico y agua (B) en un gradiente con 100% B a los 24 minutos. Las condiciones fueron de una ionización positiva de 2,5K en HESI, con una temperatura capilar de 340°C, un flujo de gas nitrógeno 35 unidades y gas auxiliar de 10 unidades, con un barrido de 90 a 1200 m/z. Para expresar el resultado obtenido, se realizó una curva de calibración utilizando estándares de los metabolitos detallados (Cuadro 3.4). Estas se identificaron basándose en los tiempos de retención y fragmentación m/z, comparados con sus estándares internos. Los datos se expresaron en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la muestra.

Tipo compuesto	Nombre compuesto
	Catequina
	Cloruro de cianidina
	Rutina
	Hiperósido
Flavonoides	Apigenina-7-O glucósido
	Quercitrina
	Epicatequina
	Ácido 4-cumárico
	Procianidina A2
	Quercitina

Cuadro 3.4. Flavonoides (Catequina, cloruro de cianidina, rutina, hiperósido, apigenina 7-O glucósido, quercitrina, epicatequina, Ácido 4-cumárico, procianidina A2, quercitina) que se buscó identificar en piel de manzanas cv. Cripps Pink.

3.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Para el análisis del ensayo se utilizó un diseño completamente al azar con ANDEVA simple de los parámetros de calidad y compuestos fenólicos. Los datos recopilados fueron analizados con el software Statgraphics Technologies, Inc. (Virginia, EE.UU.) y graficados con el software GraphPad Prism 6 ©, (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). La prueba estadística usada para determinar diferencias entre tratamientos fue un análisis de varianza (ANDEVA, $p < 0,05$), utilizando una prueba de rangos múltiple de Tukey (HSD). La unidad experimental correspondió a 20 manzanas, utilizando 10 repeticiones por tratamiento.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del PFA sobre índices de madurez de manzanas cv. Cripps Pink

Los índices de madurez obtenidos desde las manzanas cv. Cripps Pink a la cosecha coinciden con los parámetros propuestos comercialmente para este cultivar (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Promedios de índice de madurez de manzanas cv. Cripps Pink para control a cosecha.

Peso (g)	Nivel de clorofila (lad)	Firmeza (lb)	Sólidos solubles (°Brix)	Almidón (1-10)	Color de fondo (1-4)	Color de cubrimiento (%)
192,5 ± 15,1	0,229 ± 0,8	17,2 ± 1,8	13,8 ± 1,2	9	2,6 ± 0,2	88,7 ± 11,5

Al comparar los dos controles, tanto a cosecha (cuadro 4.1) y a los 90 días (cuadro 4.2), se distinguen diferencias claras. Esto debido al tiempo que estuvo la fruta almacenada en frío. Por ejemplo, el peso bajó un 7,7% durante el tiempo de almacenaje, al igual que la concentración de clorofila que disminuyó un 26,2%. La firmeza también se vio afectada bajando un 21,7%. Los sólidos solubles no tuvieron una disminución relevante. El color de fondo se acercó más al amarillo, ya que aumentó un 16,4% y para el color de fondo tendió a permanecer rojo, ya que solo bajó un 2,5%.

Cuadro 4.2. Índices de madurez (promedios y desviación estándar) de manzanas cv. Cripps Pink sometidos a tratamientos de plasma frío atmosférico (PFA) después de 90 días de almacenaje a 4°C.

Tratamientos	Parámetros evaluados					
	Peso (g)	Nivel de clorofila (I_{ad})	Firmeza (lb)	Sólidos solubles (°Brix)	Color de fondo	Color de cubrimiento (%)
Control	177,2 ±17,9	0,16 ±0,07 b	13,5 ±1,8 a	13,9 ±0,8	3,0 ± 0,6 a	86,5 ±9,8 c
PFA-90	178,8 ±14,9	0,16 ±0,06 b	15,2 ±1,2 b	14,5 ±1,1	4,0 ± 0,1 b	79,0 ±13,7 b
PFA-0-90	169,6 ±17,6	0,11 ±0,07 a	13,4 ±1,9 a	13,9 ±0,5	3,4 ±0,6 a	71,7 ±7,1 a
Valor-P	0,460	0,034	0,002	0,060	0,0001	0,002

Los valores de promedios y desviación estándar seguidos por letras diferentes en columnas indican diferencias significativas según prueba de rango múltiple de Tukey (HSD) ($P < 0,05$).

En el caso del parámetro peso, no se presentó diferencias significativas (valor- $p=0,460$) para ninguno de los tratamientos. De igual manera, en el parámetro de sólidos solubles (valor- $p=0,060$), no se detectaron diferencias entre las manzanas sometidas a PFA y las manzanas controles (sin aplicación de PFA) Cuadro 4.2. Referente a los grados Brix en manzanas, se recomienda que sea entre 14 y 15, pero no menor a 13, ya que influye de gran manera en el sabor de los frutos y en la aceptabilidad (Hernández et al., 2010). En este caso, la exposición al plasma frío no generó cambios en el peso como en los sólidos solubles, siendo dos parámetros importantes en la calidad.

De otra forma, para los parámetros de calidad como el nivel de clorofila, firmeza, color de fondo y color de cubrimiento, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos contemplados en el estudio (Cuadro 4.2). En relación al nivel de clorofila, este mostró diferencias significativas solo con las manzanas expuestas al plasma (tratamiento PFA-0-90) a los 0 y 90 días versus al tratamiento sin aplicación (control) y tratamiento de exposición al plasma a los 90 días (PFA-90) (Cuadro 4.2). Es más, en el caso de las manzanas con dos aplicaciones de plasma, es decir el tratamiento PFA-0-90, significó una disminución del 31% con respecto del nivel de clorofila en las manzanas controles (sin exposición a plasma) como de las manzanas con una única aplicación de plasma. El DA-meter calcula el cambio de absorbancia entre dos longitudes de onda (670 y 720 nm) cercanas al nivel más alto de absorción para calcular el índice diferencial de absorbancia (I_{ad}) (DeLong et al., 2014). Según el mismo autor, el período óptimo de cosecha en variedad Honeycrisp™, al comenzar la cosecha es de 0,59 unidades I_{ad} y al terminar la cosecha 0,36 unidades de I_{ad} , para un almacenaje prolongado. En este caso los valores obtenidos en el presente trabajo son relativamente bajos, debido a que pasaron 90 días en almacenaje a 4°C, coincidiendo con DeLong et al. (2014), que durante almacenaje estos valores bajan. En este sentido, es posible que la aplicación de plasma realizada inmediatamente

después de cosecha, sea en parte la que produzca la baja de clorofila, pero este aspecto debe ratificarse y estudiarse para tener una mejor claridad al respecto.

Según Fresno et al., (2014), la degradación del almidón es uno de los índices más satisfactorios a la hora de cosechar, la cual debería realizarse con un índice de 3,5 (escala 1–10). En el análisis a cosecha de los índices de madurez (Cuadro 4.1), se puede apreciar que para el almidón se obtuvo un índice de 9, lo cual indica una alta degradación del almidón. De acuerdo con algunos autores, el almidón se modificaría con el uso de PFA. Probablemente, esto ocurriría por dos mecanismos principalmente, el entrecruzamiento de los gránulos de almidón y la despolimerización. Este último mecanismo puede llevarse a cabo en las cadenas laterales de amilopectinas o en el quiebre de los enlaces glucósidos que están cerca de estas cadenas (Thirumndas et al., 2014). Esto puede explicar la fuerte degradación que tuvieron las manzanas, posterior a la aplicación de plasma (Plasma 90 días; Plasma 0 y 90 días), no se incluyeron en el Cuadro 4.2, ya que estos obtuvieron todos un índice de 10.

En cuanto a la firmeza, hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control (valor- $p= 0,0022$), donde PFA-0-90 bajó un 11% respecto a PFA-90, por lo contrario, el PFA-90 días, es decir solo una aplicación, aumentó la firmeza un 11,3 % respecto del control (sin exposición a plasma). Al igual que el almidón, la firmeza es fundamental para una posterior comercialización, este índice debe ser entre las 20 a 17 lb a cosecha (Hernández et al., 2010). Comparados con los resultados obtenidos, entre 15 a 13 lb, cabe señalar que son datos bastante bajos para fruta de exportación. Se aprecia una clara diferencia en el cuadro 4.2 de PFA-90 días respecto a los demás tratamientos, con esto podemos decir que una aplicación de PFA (PFA-90) y posterior almacenamiento por 90 días en frío (4°C) mantuvo una cierta firmeza, comparado con las dos aplicaciones de PFA (PFA-0-90). En el estudio de Niemira et al. (2008) ningún gran cambio fue evidente en cuanto a color y textura en todos los tratamientos con plasma frío en la superficie de manzanas cv. Golden Delicious. No obstante, Tappi et al. (2013) encontraron que la firmeza tiende a aumentar en cortes de manzana con el tratamiento de plasma frío.

En el color de fondo, se aprecia que las manzanas con la aplicación de Plasma a 0 y 90 días (PFA-0-90) de almacenamiento fue 16% menor que las manzanas con la aplicación de plasma solo después de 90 días de almacenamiento (PFA-90), lo cual indicaría que luego de la segunda aplicación de Plasma (tratamiento PFA-0-90) esta fruta permaneció más verde que PFA-90. Respecto al color de cubrimiento, igualmente mostró diferencias significativas (valor- $p= 0,002$), PFA-90 tuvo un 9% y PFA-0-90 un 17% menos porcentaje de color rojo que el control a los 90 días, el porcentaje de color rojo en la piel de las manzanas fue menor con PFA. El color de fondo está dado por pigmentos del tipo clorofilas, el color rojo va aumentando de manera que la fruta madura, es decir que mientras más tiempo dura la postcosecha en manzanas el valor de esta escala será más alto por lo que se debe cosechar aún verde (1-2) y para el color rojo (o de cubrimiento) de las manzanas, este se mide de acuerdo al porcentaje de coloración ubicado en

la superficie de este fruto, dado por las antocianinas (Hernández et al., 2010). El color rojo en cosecha debe cubrir un 40% o más de la superficie, lo cual es importante para que esta variedad sea categorizada como Pink Lady™ (Fresno et al., 2014). En estos dos índices, no se mostraron grandes diferencias significativas, igualmente, se aprecia que la fruta tratada con PFA tuvo una menor coloración respecto a los controles, lo que puede beneficiar la prolongación de la calidad en cuanto al color en postcosecha de las manzanas. Las pocas diferencias entre los tratamientos con PFA y el control pueden compararse con el estudio de Niemira et al., (2008) donde examinaron luego de la aplicación de PFA en manzanas cv. Golden Delicious y no observaron decoloraciones ni daños sensoriales graves. Según Tappi et al., (2014) en el tratamiento de plasma a través de descarga de barrera dieléctrica (DBD) en cortes de manzana, se observó que una exposición al plasma de 30 min con un posterior almacenamiento durante 4 horas disminuye el oscurecimiento con respecto al control. Lo cual, en el estudio de Tappi et al., (2014) se podría relacionar con la inhibición del pardeamiento enzimático.

4.2 Efecto del PFA en el control de Ojo de Buey en manzanas cv. Cripps Pink, almacenadas por 90 días

Todos los tratamientos con plasma, incluyendo a las manzanas sin exposición (tratamiento control) desarrollaron diferentes niveles (%) de Ojo de Buey (Figura 4.2). Las manzanas sin aplicación (control) desarrollaron entre un 8 y 15%, con un promedio de 13% de Ojo de Buey, siendo similar a lo obtenido de las manzanas con el tratamiento de plasma a los 90 días, con un rango de 5 a 17% y un promedio de 12%. En cambio, las manzanas con tratamientos de plasma de 0 y 90, se observaron con un rango de 3 a 7% de Ojo de Buey, con un promedio de 5,2%. (Figura 4.2). Por lo tanto, este trabajo indica que hay un efecto positivo en reducir la expresión de Ojo de Buey en manzanas sometidas a plasma previo al almacenaje. Por esta razón, el tratamiento de 90 no tuvo efectos sobre el desarrollo de esta enfermedad, debido a que la enfermedad se desarrolla antes de los 90 días de almacenaje. Sin lugar a duda, por la importancia que podría ejercer esta tecnología en el control del hongo *Neofabraea vagabunda*, es necesario ratificar y profundizar. Cabe mencionar, si bien no se comparó estadísticamente, las manzanas sin tratamiento, presentaron un alto nivel de lesiones con Ojo de Buey en la zona peduncular.



Figura 4.1. Síntomas de Ojo de Buey en manzanas cv. Cripps pink sin exposición al tratamiento de plasma (tratamiento control), después de 90 días de almacenamiento.

La patología de postcosecha Ojo de Buey es producido por varias especies de *Neofabraea* reportadas en el mundo (Sutton et al., 2014). En Chile, se identificó como *Neofabraea vagabunda* (Henríquez et al., 2005). La infección de este patógeno ocurre en el huerto, inclusive días previos a la cosecha, manteniéndose latente, hasta expresarse luego de 3 meses de almacenaje en frío (0°C) (Spotts, 1990; Sutton et al., 2014). Por lo tanto, el trabajo actual ratifica que la expresión de Ojo de Buey no es antes de dos meses, aunque depende mucho del estado sanitario del huerto, del nivel de presión de inóculo de *N. vagabunda* y de las condiciones de agua libre presentes en el huerto, como así del programa enfocado a Ojo de Buey.

El potencial de la aplicación de plasma para la inactivación de microorganismos es debido a que las especies que reaccionan con el plasma dañan el ADN en los cromosomas de los microorganismos expuestos. Estudios señalan que la aplicación de plasma da como resultado la formación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) en células microbianas, produciendo daños a las células (Thirumdas et al., 2015). Una alta producción de ROS, tales como radicales OH^\cdot , H_2O_2 e iones H_3O^+ , que tienen un alto efecto bactericida, produjeron un efecto de inactivación significativa, la cual en PFA en aire depende del tiempo expuesto al plasma y del tipo de células del objeto en estudio (Lu et al., 2014).

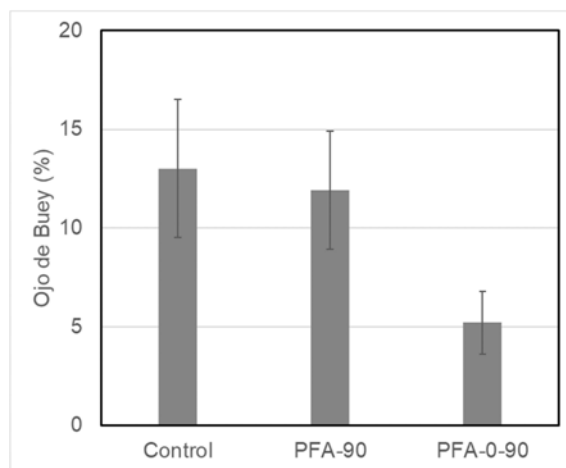


Figura 4.2. Porcentaje de manzana cv. Cripps Pink con síntomas de Ojo de Buey después de los tratamientos con plasma frío atmosférico (PFA) de manzanas cv. Cripps Pink, almacenadas por 90 días.

En el estudio de Niemira et al., (2008) se observaron reducciones de dos patógenos (*Salmonella* Stanley y *Escherichia coli* O157:H7) en superficie de manzana cv. Golden Delicious en diferentes tratamientos de plasma frío en cuanto a tasas de flujo y tiempo de exposición del PFA. Se observó que en general, mientras más tiempo de exposición al plasma y mayores tasas de flujo, las tasas de muerte de los patógenos eran más altas. Por ejemplo, hubo un efecto adicional en la inactivación de los patógenos a medida que la tasa de flujo se incrementaba (10 L/min, 20 L/min, 30 L/min y 40 L/min). Esto puede ser a causa de la oxidación de ADN, proteína y lípidos durante el tratamiento de PFA (Joshi et al., 2011). En este sentido, el actual estudio demuestra la potencialidad que podría tener este tipo de tecnología en poder disminuir problemas patológicos importantes. Sin embargo, es necesario seguir estudiando tanto en los tiempos de exposición como de la exposición completa de la manzana y sus posibles alteraciones a nivel de tejidos en los frutos.

4.3 Perfil fenólico

Se logró obtener muestras desde la piel de las manzanas utilizando la metodología descrita y detección mediante el análisis por cromatografía de alta resolución de masa, compuestos fenólicos incluyendo a catequina, cloruro de cianidina, rutina, hiperósido, apigenina, quercitrina, epicatequina, ácido 4-cumárico, procianidina A2 y quercitina.

Para los compuestos fenólicos como cloruro de cianidina, rutina, hiperósido, quercitrina, procianidina A2, catequina, epicatequina y quercitina, no se encontraron diferencias significativas entre las manzanas no expuestas (tratamiento control) y frutos expuestos a PFA (solo aplicación después de cosecha) Cuadro 4.3. y Figura 4.3.

Cuadro 4.3. Promedios de la concentración (ng/gPF) de flavonoides obtenidos a través de la cromatografía líquida del análisis de la piel desde manzanas cv. Cripps Pink para frutos sin exposición a plasma (tratamiento control), PFA-90 (aplicación de plasma a los 90 días) y PFA-0-90 (aplicación de plasma a cosecha y a 90 días).

Tratamiento	Cloruro de cianidina	Rutina	Hiperósido	Quercitrina	Procianidina A2
Control 0	42,5 ± 45,6	763.512 ± 313.830	1,1 ± 0,76	0,05 ± 0,067	9,4 ± 4,1
Control 7	20,2 ± 14,9	823.836 ± 445.011	2,0 ± 3,59	0,002 ± 0,025	7,8 ± 3,9
Plasma 0	22,3 ± 16,4	848.767 ± 564.470	1,2 ± 1,26	0,001 ± 0,00	7,1 ± 5,8
Plasma 7	11,5 ± 5,8	886.039 ± 451.229	1,1 ± 0,90	0,05 ± 0,11	6,9 ± 4,2
Valor-P	0,1793	0,9515	0,1055	0,4002	0,7675

Estudios previos, han demostrado que la piel de la manzana posee una alta concentración de compuestos fenólicos (Wolfe et al., 2003). Es más, el actual estudio ratifica una importante presencia de compuestos fenólicos en la piel de la manzana, pero que sus niveles no alcanzaron a ser diferentes estadísticamente cuando fueron expuestos a PFA (después de cosecha). Por lo tanto, es necesario investigar en profundidad la interacción del PFA y la piel de la fruta.

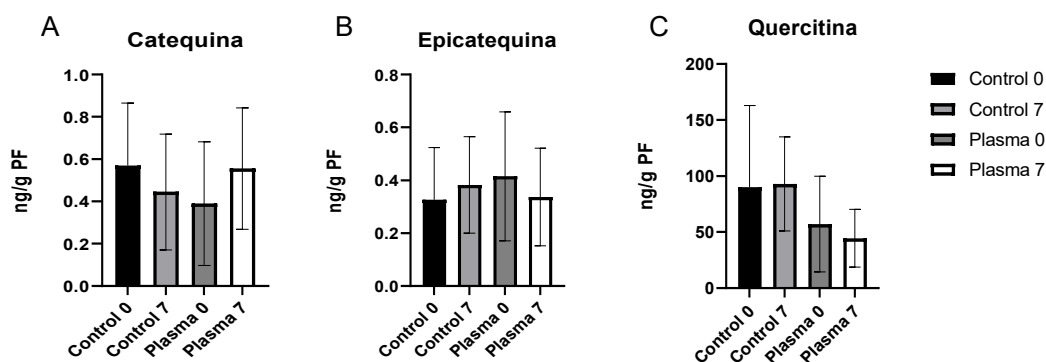


Figura 4.3. Efecto de la aplicación de plasma (después de cosecha) sobre los niveles de compuestos fenólicos catequina (A), epicatequina (B), y quercitina (C) en la piel de manzanas cv. Cripps Pink. Tratamiento control, corresponden a manzanas no expuestas a plasma.

Un estudio realizado por Kondo et al. (2002) muestra que en tres variedades diferentes de manzanas cvs. Redfield, Fuji y Orion, tienen diferentes concentraciones de epicatequina, resultando en este caso que el cv. Redfield obtuvo la mayor concentración. Esto demuestra que no necesariamente las diferentes variedades de manzanas que existen tienen similares concentraciones de antioxidantes, la actividad antioxidante es diferente de acuerdo al cultivar. Es por esta razón, es importante expandir este estudio con otros cultivares para evaluar este efecto. Es destacable que, al realizar una suma total de compuestos fenólicos, la cantidad en las manzanas tratadas a 0 días, se incrementó en un 14,4% comparado a las manzanas no expuestas a PFA. Esto nos podría indicar un posible rol protector de este mayor nivel de

compuestos fenólicos totales en manzanas contra de Ojo de buey. Es necesario seguir estudiando este aspecto relevante.

Tratamiento	SUMA
Control T0	780903,05
Control T7	823962,25
Plasma T0	886127,36
Plasma T7	848831,70

Existe poca literatura disponible sobre el efecto del tratamiento de PFA en los componentes fenólicos en manzana cv. Cripps Pink. Este estudio se puede comparar con el trabajo de Ramazzina et al. (2016), el cual no obtuvo diferencia significativa en el total de contenido fenólico evaluado a través de HPLC-MS/MS, comparado con el control en manzanas Pink Lady expuestas a descargas de plasma de doble barrera (DBD plasma). Al contrario, Rodríguez et al., (2017) obtuvieron un incremento significativo de vitamina C, flavonoides y polifenoles en jugos de castaña de caju (*Anacardium occidentale*) expuestos a plasma.

Investigaciones recientes de Grzegorzewski et al. (2010) utilizando plasma de oxígeno a baja presión, se pudo observar una degradación de los flavonoides, lo cual es estrictamente dependiente del tiempo y la estructura de la aplicación del plasma, esta degradación es debido a las especies reactivas que se generan a partir del plasma, tales como el ozono o los radicales hidroxilos. Según Percival (1998), los antioxidantes protegen a las células contra los efectos dañinos de las ROS, como los oxígenos, superóxido, radicales de peroxilo, hidroxilos y peroxinitritos, entre otros. Esto podría estar relacionado con la disminución de la epicatequina y quercitina, como también con inhibición en el caso del ácido cumárico con la aplicación del PFA en las manzanas cv. Cripps Pink.

Otro estudio sobre el efecto de PFA de alto voltaje sobre jugo de uva blanca, se observó que al incrementar el tiempo de la exposición del tratamiento de PFA sobre el jugo de uva, este tratamiento reduce significativamente ($p < 0,05$) los fenoles totales y flavonoides totales (Pankaj et al., 2017). Coincidiendo esto también es indicado por el estudio de Rodríguez et al. (2017), quienes indican que un exceso de plasma provoca una disminución de los niveles de vitamina y polifenoles en el jugo de castaña de caju (Rodríguez et al., 2017). Por lo tanto, es importante ampliar los estudios sobre los factores asociados al tiempo de exposición y distancia entre los electrodos y la fruta en el este caso, para obtener un proceso que optimice la calidad de los productos agrícola.

6. CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones del presente estudios se concluye que:

El tratamiento de plasma frío atmosférico no produjo cambios significativos en parámetros de calidad y en el contenido de compuestos fenólicos de las manzanas cv. Cripps Pink.

Interesantemente, el tratamiento de plasma frío atmosférico produjo una disminución de la expresión de Ojo de Buey en las manzanas con la aplicación de 0 días.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adonis, R. 2016. Conociendo las nuevas normas de inocuidad alimentaria estándares FDA para frutas y hortalizas frescas (campo) [Diapositivas de powerpoint] Recuperado el 3 de mayo, 2018. Consultado el: http://www.apeco.cl/wp-content/uploads/2016/07/presentacion-INOCUIDAD-FSMA-curso-basico-campo_enviar.pdf

Alonso-Salces, R. M., Ndjoko, K., Queiroz, E. F., Isolet, J. R., Hostettmann, K., Berrueta, L. A., Gallo, B., and Vicente, F. 2004. On-line characterization of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection, *Journal of Chromatography A*, 1046: 89-100.

Anderson, R. E. 1967. Experimental storage of Eastern grown 'Delicious' apples in various controlled atmospheres. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 91: 810-820.

Bartram, E. J., J. Fountain, K. Olsen, and O'Rourke, D. 1983. *Proc. Wash. State Hort. Assoc. EE. UU.* 79: 36-46.

Blanpied, G.D. 1977. *Proc. Second Nat. C.A.Z< Res. Conf., Mich. State Univ. Rep. D.H. Dewey (Ed.). Michigan. EE.UU.* 28: 225-230.

Boyer, J., and Liu, R. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition journal*, 3(1), 5p.

Bowen, J. H., and Watkins, C. B. 1997. Fruit maturity, carbohydrate and mineral content relationship with watercore in 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology* 11:31-38.

Bravo, J., 2013. Manzanas: Una temporada de alto valor de exportaciones. *Boletín Técnico. ODEPA, Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile.* 13p.

Brown, G. K., N.L. Schulte, E.J. Timm, P.R., and Armstrong, D. E. 1993. *Marshall. Reduce apple bruise damage. Tree Fruit Posth. J.* 4(3): 6-10.

Cappellini, R. A., M. J. Ceponis, and Lightner, G. W. 1987. Disorders in apple and pear shipments to the New York market. *Plant Disease* 71: 852-856.

De Castro, E., W. V. Biasi, E. J. Mitcham, S. Tustin, D. Tanner, and Jobling, J. 2007. Carbon Dioxide-induced Flesh Browning in Pink Lady Apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132 42: 713-719.

DeLong, J., Prange, R., Harrison, P., Nichols, D. and Wright, H. 2014. Determination of optimal harvest boundaries for Honeycrisp™ fruit using a new chlorophyll meter. *Can. J. Plant Sci.* 94: 361–369.

Dewey, D. H., and Schueneman, T. J. 1971. Quality and packout of storage apples, their effects on costs and returns. *Mich. State Univ. Agr. Exp. Sta. Res. Rep.* 147, East Lansing, Michigan. E.E. U.U.

Dilley, D. R. 2010. Controlled atmosphere storage – chronology and technology. *Acta Hort.* 857: 493-502.

Faust, M., and Shear, C. B. 1968. Corking disorders of apples: A physiological and biochemical review. *Bot. Rev.* 34: 441-469.

Faust, M., Shear, C. B., and Williams, M. W. 1969. Disorders of carbohydrate metabolism of apples (watercore, internal breakdown, low temperature and carbon dioxide injuries). *Bot. Rev.* 35: 169-194.

Ferguson, I. B., and Watkins, C. B. 1989. Bitter pit in apple fruit. *Hort. Rev.* 11: 289-355.

Ferrada, E.E., Lolas, M., Pacheco, C., and Díaz, G. A. 2017. Occurrence of severe outbreak of calyx-end rot associated with *Botrytis cinerea* in *Malus × domestica* cv. Cripps pink during harvest in the Maule region, Chile. *Plant Disease.* 101: 2149-2149.

Fresno A., Lepe V., Hernández O., y Torres C., 2014. Cripps Pink (Pink Lady™) Consideraciones técnicas. *Boletín Técnico.* Vol. 12. Universidad de Talca. Talca. Chile. 6p.

Gil, G. F. 1993. In: Avances recientes en nutrición de plantas frutales y vides. Seminario, Pont. Univ. Cat. Chile, 5-6 agosto, Santiago. Chile. p. 143-168p.

Gil, G. F. 2012. Fruticultura: Madurez de la fruta y manejo postcosecha. Tercera Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. p. 129-165p.

Gil, G. F. 2009. Crecimiento vegetativo y diseños de huertos y viñedo. Cuarta Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 398p.

Grzegorzewski, F., Rohn, S., Kroh, L. W., Geyer, M., and Schluter, O. 2010. Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. *Food Chem.* 122: 1145-1152.

Han, L., Patil, S., Boehm, D., Milosavljević, V., Cullen, P.J., and Bourke, P. 2015. Mechanisms of inactivation by high voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(2):450–58.

Harborne, J. B., and Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6): 481–504.

Henríquez, J. 2005. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. *Plant Disease* 89: 1360.

Hernández O., Fuentes M., Sepúlveda A., Torres C., Yuri J., 2010. Análisis de postcosecha temporada 2009/2010. Centro de pomáceas. Universidad de Talca. Talca, Chile. 10(6): 10p.

Joshi, S. G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U. K., Fridman, G., and Brooks, A. D. 2011. Nonthermal Dielectric-Barrier Discharge Plasma-Induced Inactivation Involves Oxidative DNA Damage and Membrane Lipid Peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3): 1053–1062.

Kondo, S., Tsuda, K., Muto, N., and Ueda, J. 2002. Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 96: 177–185.

Kupferman, E. 1997. Proc. 7th Int. CA Conf. Vol., Apples and pears, Univ. Calif. Posth. Hort. Ser. E. J. Micham (Ed.), Davis. California. EE.UU. 16: 1-30p.

Latorre, B.A. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Primera edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 733p.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., and Lee, C. Y. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6516-6520.

Leontowicz H., Gorinstein S., Lojek A., Leontowicz M., Ciz M., Soliva-Fortuny R., Park Y., Jung S., Trakhtenberg S., and Martin-Belloso O. 2002. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches, and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity of rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 603–610.

Lu, H., Patil, S., Keener, K. M., Cullen, P. J., and Bourke, P. 2014. Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4): 784–794.

Mietto, F. 2010. GLOBAL G.A.P y el avance mundial en la aplicación de las BPAs. Boletín técnico vol. 1. INOFOOD, Santiago, Chile. 32 p. Recuperado en: <http://www.inofood.cl/neo_2010/pdf/presentaciones_2010/la_serena/06%20FERNANDO%20MIETTO%20-%20GLOBALGAP.pdf> Consultado el: 30 de Abril de 2018.

Meheriuk, M. 1993. Storage conditions for apples, pears and nashi. Proc. 6th Int. CA Res. Conf., p. 819-858.

Misra, N.N., Schluter, O., and Cullen, P.J. 2016. Cold Plasma in food and agriculture: Fundamentals and applications. Primera edición. Editorial Academic Press Elsevier. Londres. Reino Unido. 380p.

Misra, N.N., Moiseev, T., Patil, S., Pankaj, S.K., Bourke, P., Mosnier, J.P., Keener, K.M., and Cullen, P.J., 2014. Cold plasma in modified atmospheres for post-harvest treatment of strawberries. Food Bioprocess Technol. 7: 3045-3054.

Misra, N.N., Patil, S., Moiseev, T., Bourke, P., Mosnier, J.P., Keener, J.M., and Cullen, P.J., 2014b. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. J. Food Eng. 125: 131-138.

Niemira B., and Sites J., 2008. Cold plasma inactivate *Salmonella Stanley* and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on Golden Delicious apples. Journal of Food Protection. 71: 1357-1365.

Oey, L., Lille, M., Van Loey, A., and Hendrickx, M., 2008. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review. Trends Food Sci. Technol. 19: 320-328.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2019. Boletín de fruta fresca. Boletín Técnico. Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. Recuperado en: <<https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-fruta-fresca-junio-de-2019>>. Consultado el 11 de noviembre del 2019.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2018. Boletín de fruta fresca. Boletín Técnico. Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. Recuperado en: <<https://www.odepa.gob.cl/contenidos-rubro/boletines-del-rubro/boletin-de-fruta-fresca-octubre-de-2018>>. Consultado el 11 de noviembre del 2019.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2013. Mercado de la manzana: Una temporada de alto valor de exportaciones. Mercados agropecuarios, avance octubre 2013.

Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. Recuperado en: <<https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2013/10/manzanas201310.pdf>>. Consultado el 20 de enero del 2018.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2011. Mercado de la manzana. Mercados agropecuarios, avance octubre 2011. Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. Recuperado en: <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/Mercados/oct-11.pdf>>. Consultado el 20 de enero del 2018.

Ortiz, A., G. Echeverría, J. Graell, and I. Lara. 2010a. Cell wall modification during on-tree development and maturation of 'Golden reinders' apples. *Acta Hort.* 858: 213-216.

Ortiz, A., G. Echeverría, J. Graell, and I. Lara. 2010b. The emission flavor-contributing volatile esters by "Golden Reinders" apples is improved after mid-term storage by postharvest calcium treatment. *Postharvest Biology and Technology* 57: 114-123.

Pankaj, S. K., Wan, Z., Colonna, W., and Keener, K. M. 2017. Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(12): 4016–4021.

Percival, M. 1998. Antioxidants. *Clinical nutrition insights*. NUT031 1/96 Rev. 10/98. Advanced Nutrition Publications, Inc. p 4.

Pirlak, L., Unuvar, G., and Ersoy, N. 2017. Determination of antioxidant activities of some apple cultivars. *Hort. Sci. Prague*, 44: 120-125.

Ramazzina, I., Tappi, S., Rocculi, P., Sacchetti, G., Berardinelli, A., Marseglia, A., and Rizzi, F. 2016. Effect of cold plasma treatment on the functional properties of fresh-cut apples. *J. Agric. Food Chem.* 64: 8010–8018.

Retamales, J. B., C. Moggia, y Yuri, J. A.. 1993. In: *Avances recientes en nutrición de plantas frutales y vides*, Seminario, Pont. Univ. Cat. Chile, 5-6 agosto, Santiago. Chile. p. 169-195.

Retamales, J., y Valdes, C. 2005. *Boletín Técnico Centro de Pomáceas Vol. 3*. Universidad de Talca. Talca- Chile. 4p.

Rodríguez, Ó., Gomes, W. F., Rodrigues, S., and Fernandes, F. A. N. 2017. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). *Food science and technology*. *LWT*, 84: 457–463.

Rudell D.R., Mattheis, K.P., and Hertog, M. 2009. Metabolomic Change Precedes Apple Superficial Scald Symptoms. *J. Agric. Food Chem.* 57: 8459-8466.

Schrader, L. E., Zhang, J., Sun, J., Xu, J., Elfving, D.C., and Kahn, C. 2009. Postharvest changes in internal fruit quality in apples with sunburn browning. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134: 148-155.

Segura-Ponce, L., Reyes, L., Troncoso-Contreras, G., and Valenzuela-Tapia, G. 2018. Effect of Low-pressure Cold Plasma (LPCP) on the Wettability and the inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on Fresh-cut Apple (Granny Smith) skin. *Food and Bioprocess Technology.* 1-10.

Sharples, R. O., and Johnson, D. S. 1977. The influence of calcium on senescence changes in apple. *Ann. Appl. Biol.* 85: 450-453.

Siddiqui, S., and Bangerth, F. 1996. The effect of calcium infiltration on structural changes in cell walls of stored apples. *J. Hort. Sci.* 71: 703-708.

Silva, F., B. Goyette, G. Bourgeois, and C. Vigneault. 2006. Comparing forced air cooling and water cooling for apples. *J. Food Agr. Environ.* 4:33-36.

Simons, R. K. 1968. The morphological and anatomical characteristics of watercore in apples. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 93: 762-774.

Soto-Alvear, S., Lolas, M., Rosales, I. M., Chávez, E. R., and Latorre, B. A. 2013. Characterization of the Bull's eye rot of apple in Chile. *Plant Disease.* 97: 485-490.

Spotts, R. 1990. Bull's eye rot p. 56. En: Jones A. L. and Aldwinckle H.S. (eds.) *Compendium of Apple and Pear Diseases*; American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 100 p.

Sun, J.; Chu, Y. F.; Wu, X.; and Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50 (25): 7449-7454.

Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Agnello, A. M., and Walgenbach, J. F. 2014. *Compendium of apple and pear diseases and pest.* Second edition. APS Press, The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 218.

Tappi, S., Berardinelli, A., Tagni, L., Dalla Rosa, M., Guarnieri, A., and Rocculi, P., 2014. Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol*, 21: 114-122.

Thirumdas R., Sarangapani Ch., and Annapure U., 2015. Cold plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics*. 10: 1-11.

Torres, C., Hernández O., y Fuentes M., 2012. Escaldado superficial en manzanas: nuevos desafíos. *Boletín Técnico Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca. Chile* 12.6.

Van Lune P., B.J. Van Goor. 1979. Extractability of calcium from apple fruit and apple leaf tissue and the occurrence of bitter pit. *J. Hort. Sci.* 54: 327-331.

Wolfe, K., Wu, X., and Liu, R. H. 2003. Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 609–614.