



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACION BIOQUÍMICA EN FRUTOS DE CEREZO
(*PRUNUS AVIUM* L.) 'SANTINA' CULTIVADO BAJO
AMBIENTES MODIFICADOS**

MEMORIA DE TÍTULO

CRISTIAN DARIO ARTURO TAPIA RECABAL

TALCA, CHILE

2020

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.



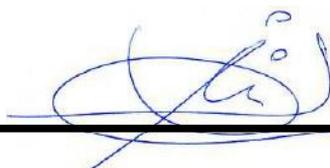
Talca, 2020

APROBACIÓN:



Profesor guía:

Ing. Agr. Dr. José Antonio Yuri Salomón
Profesor Escuela de Agronomía
Centro de Pomáceas Facultad
de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca



Profesor co-guía:

Ing. Agr. Dr. (c) Javier Sánchez Contreras
Unidad del cerezo
Centro de Pomáceas Facultad
de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca

Fecha de presentación de la Defensa de Memoria: 28 de mayo de 2020.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al profesor José Antonio Yuri por ser mi Profesor Guía y al Centro de Pomáceas (CP) por darme la posibilidad de realizar mi memoria de pregrado en la Unidad del Cerezo, por permitirme usar las instalaciones y llevar a cabo todas las evaluaciones de mi estudio que me ayudaron a mejorar mis conocimientos teóricos, llevándolos a la práctica en conjunto con otros profesionales del CP. También agradezco a la empresa Inés Escobar S.A por la autorización para la recolección de frutos y por permitir el uso de sus instalaciones.

De manera personal, agradezco a mi Profesor Co-guía Javier Sánchez C. por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas, aportar conocimiento, anécdotas y por enseñarme todo lo necesario para la manipulación del equipo HPLC. A Miguel Palma, por generar en mí ese pensamiento crítico tan importante para realizar un ensayo y por las herramientas que me brindó para trabajar mis datos de manera didáctica; y a Brenda Fuentes, por enseñarme y ayudarme a realizar los análisis para las determinaciones bioquímicas de los ensayos.

Para concluir agradezco a mis siempre presente compañeros y amigos, Gonzalo Garcés, Diego Montenegro y Matías Arévalo, quienes en todo momento me brindaron la precisa atención mezclada con un sin fin de momentos agradables y, en otras ocasiones, en donde sólo bastaba una palabra para disfrutar de la mejor manera todo este proceso universitario.

A mis padres, hermano, pareja e hija por la comprensión y apoyo durante todo este proceso, siempre dándome ánimo para seguir adelante y tratar de hacerlo lo mejor posible.

RESUMEN

Cada año en Chile se incrementa la superficie cultivada de cerezos (*Prunus avium* L.), debido a la gran demanda y altos retornos económicos que obtiene su fruta en los mercados asiáticos. También en los últimos años se han incrementado los efectos de los cambios en el clima a nivel mundial y los productores se han visto en la necesidad de emplear nuevas tecnologías de protección para sus cultivos, como lo es el uso de cubiertas protectoras de lluvia, impidiendo que la fruta sea dañada por partiduras (*cracking*). Otra de las nuevas tecnologías empleadas son los túneles altos, que, además de proteger la fruta de la lluvia, afecta a la fenología del cultivo, permitiendo adelantar la cosecha, obteniendo mejores retornos económicos.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de cubiertas protectoras de lluvia y de túneles altos, en la síntesis de pigmentos y concentración de fenoles en la fruta. El ensayo fue llevado a cabo en el huerto Santa Carmen, ubicado en la comuna de Sagrada Familia (35°01'41.7" S 71°26'50.6" W), Región del Maule, Chile, durante la temporada 2018-2019. Los parámetros bioquímicos evaluados en la fruta fueron las concentraciones totales de antocianinas, clorofilas, carotenoides, fenoles y los fenoles específicos, así como la capacidad antioxidante. El cultivar estudiado fue 'Santina' sobre portainjerto 'Colt', conducido bajo el sistema *Kym Green Bush* (KGB) a una densidad de 1.136 plantas por ha.

Las evaluaciones se realizaron considerando tres tratamientos: i) control; ii) bajo cubierta antilluvia; iii) bajo macrotúnel.

Los resultados demostraron que las mayores concentraciones de antocianinas, carotenoides y actividad antioxidante se encontraron en el tratamiento control. Caso contrario ocurrió con el grupo de clorofilas y la cantidad de fenoles totales, los cuales fueron mayores en la fruta bajo túnel. En cuanto a las concentraciones de Cyanidin-3-rutinosido, éstas no fueron diferentes estadísticamente entre los tratamientos.

Palabras claves: cereza, pigmento, Chile.

ABSTRACT

Every year in Chile the cultivated area of cherry trees (*Prunus avium* L.) increases, due to the high demand and high economic returns that its fruit obtains in the Asian markets. Also, in recent years, the effects of changes in climate worldwide have increased and producers have seen the need to use new protection technologies for their crops, such as the use of protective rain covers, preventing that the fruit is damaged by cracking. Another of the new technologies used is the high tunnels, which, in addition to protecting the fruit from the rain, affects the phenology of the crop, allowing the harvest to be brought forward, obtaining better economic returns.

The objective of this study was to determine the effect of protective rain covers and high tunnels on the synthesis of pigments and the concentration of phenols in the fruit. The trial was carried out in the Santa Carmen orchard, located in the commune of Sagrada Familia (35 ° 01'41.7 "S 71 ° 26'50.6" W), Maule Region, Chile, during the 2018-2019 season.

The biochemical parameters evaluated in the fruit were the total concentrations of anthocyanins, chlorophylls, carotenoids, phenols and the specific phenols, as well as the antioxidant capacity. The cultivar studied was 'Santina' on rootstock 'Colt', driven under the Kym Green Bush (KGB) system at a density of 1,136 plants per ha. The evaluations were carried out considering three treatments: i) control; ii) under rain cover; iii) under a macrotunnel.

The results showed that the highest concentrations of anthocyanins, carotenoids and antioxidant activity were found in the control treatment. The opposite case occurred with the group of chlorophylls and the amount of total phenols, which were higher in the fruit under the tunnel. As for the concentrations of Cyanidin-3-rutinoside, these were not statistically different between the treatments

Key words: cherry, pigment, Chile.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivo General.....	3
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1 Situación actual del cerezo.....	4
2.2 Característica del fruto.....	4
2.3 Antioxidantes	5
2.4 Determinación de compuestos por HPLC.....	6
2.5 Uso de cobertores plásticos y túnel	6
3. MATERIALES Y METODO.....	8
3.1 Localización y antecedentes de la zona.....	8
3.2 Diseño experimental y toma de muestras.....	8
3.3 Materiales y tipo de estructura implementado en sistemas de cubiertas plásticas.....	9
3.4 Concentración de pigmentos	9
3.4.1 Antocianinas totales	9
3.4.2 Clorofila a, b y carotenoides	10
3.5 Preparación de extracto fenólico para la determinación de FT, ORAC y HPLC	10
3.5.1 Fenoles Totales (FT).....	10
3.5.2 Actividad Antioxidante a través del método ORAC.....	11
3.6 Separación e identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC	12
4. Resultados	14
4.1.1 Antocianinas totales	14
4.1.2 Clorofilas	18
4.1.3. Carotenoides	20
4.2 Fenoles totales	20
4.3 Capacidad antioxidante (ORAC)	22
4.4. Caracterización de fenoles específicos por HPLC	22
5.- CONCLUSIONES	26
6.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27

INDICE DE CUADROS

		Pag
Cuadro 3.1	Fechas de cosecha de cereza cultivar 'Santina' en diferentes tratamientos. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule, temporada 2018-2019.	9
Cuadro 3.2	Curva de calibración para cuantificación de Cyanidin-3-rutinosido.	13
Cuadro 4.1	Concentración pigmentos en cerezo variedad "Santina" bajo ambientes protegidos a inicio de cosecha comercial. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule, temporada 2018-2019.	14
Cuadro 4.2	Concentración de fenoles totales y capacidad antioxidante ORAC en cerezo variedad 'Santina' bajo ambientes protegidos a inicio de cosecha comercial. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule, temporada 2018-2019.	21
Cuadro 4.3	Concentración de Cyanidin-3-rutinosido en cerezo cultivar 'Santina' bajo ambientes protegidos a inicio de cosecha comercial. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule, temporada 2018-2019.	25

INDICE DE FIGURAS

		Pag
Figura 3.1	Estructura química de Cyanidin-3-arabinosido y Cyanidin-3-rutinosido	12
Figura 4.1	Temperaturas máxima y mínima de noviembre (30 d antes de cosecha) en tratamiento control, cubierta y túnel. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule. Temporada 2018-2019.	16
Figura 4.2	Concentración de antocianinas (mg/100 g PF) en cerezas 'Santina', al aire libre (control), bajo cubierta y túnel en fecha de cosecha comercial y después de 30 d de almacenaje en cámaras de frío convencional a ~0 °C y ~90% de HR.	17
Figura 4.3	Concentración de clorofilas y carotenoides en frutos bajo tratamiento control, bajo cubierta y túnel en fecha de cosecha comercial y después de 30 días de almacenaje.	19
Figura 4.4	Cromatograma del extracto fenólico de cerezas. Muestra los principales compuestos identificados: 1, Cyanidin-3-Rutinosido; 2, Peonidin-3-rutinosido; 3, Cyanidin-3-glucosido; 4, Ácido coumarico.	23
Figura 4.5	Cromatograma del extracto fenólico de cerezas cultivar 'Santina' en tratamiento control, bajo cubierta y túnel.	24

1. INTRODUCCIÓN

El cerezo (*Prunus avium* L.) es una especie que ha registrado un fuerte aumento en términos de plantación y exportación de fruta en los últimos años en Chile. Este crecimiento se debe principalmente a los altos retornos económicos generados por este frutal caducifolio, el cual es destinado casi en su totalidad al consumo en fresco, siendo Asia uno de los principales mercados de comercialización. En términos de producción, durante la temporada 2017/2018, se exportó a China aproximadamente 159.000 toneladas (t) de cerezas, mientras que para la temporada 2018/2019 se exportó cerca de 151.000 t. En cuanto al valor en el mercado de destino, durante la temporada 2017/2018 en China se alcanzaron los 6,93 USD/Kg, mientras que en la temporada 2018/2019 se llegó a 5,66 USD/Kg (ODEPA, 2019).

Las cerezas son un fruto de vida de postcosecha corta, y al ser producidas en el hemisferio Sur, en el caso de Chile, su mercado logra competir casi en solitario, siendo este uno de los factores importantes en la producción, posterior exportación y bonificación en el precio.

En Chile, para el año 2019 se habían registrado cerca de 38.400 hectáreas plantadas, concentradas principalmente en la Región del Maule y la Región del libertador Bernardo O'Higgins (ODEPA-CIREN, 2019) caracterizándose la primera por ser una región que otorga producciones de temporada media, seguida por la Región de O'Higgins que produce cosechas más tempranas, permitiendo conseguir mayores precios de retorno. Además, en el sector sur del país, principalmente en la Región de La Araucanía, se están desarrollando plantaciones de cerezos de producción tardía, las cuales también pretenden competir con los precios elevados que también se generan a final de temporada (INIA, 2012).

Las principales variedades cultivadas en Chile son 'Bing', 'Lapins', 'Santina', 'Sweetheart', 'Kordia', 'Regina' y 'Rainier'. La polinización en el cerezo es clave para obtener un buen rendimiento, por lo cual el uso de variedades polinizantes es un manejo obligatorio que cobra más importancia ante variedades tardías como 'Regina' y 'Kordia' debido a la incompatibilidad de autopolinización (INIA, 2012). Además, el cultivo en general se desarrolla sobre múltiples porta injertos, siendo 'Gisela5', 'Gisela 6', 'Maxma 14', 'CAB6P' y 'Colt' los más usados, siendo este último el patrón más plantado por su adaptabilidad a muchos tipos de suelo, especialmente a aquellos arcillosos con mayor retención de agua (Tapia, 2017).

Además, debido a la amplia difusión de plantaciones a lo largo del país se ha incursionado en zonas que no son óptimas para la producción de este frutal, debido principalmente a las lluvias primaverales cercanas a cosecha que provocan partiduras en el fruto, lo que significa inmediatamente un producto de rechazo para exportación. Ante estas adversidades climáticas se ha implementado el uso de cobertores plásticos de protección para lluvias, los cuales evitan que se deposite agua sobre la superficie cuticular del fruto y genere una eventual partidura. Por otra parte, también se han implementado el uso de túneles alto sobre las hileras de plantación, las cuales alcanzan una mayor temperatura ambiente bajo estas estructuras, acelerando así las etapas fenológicas y acortando la fecha desde floración a cosecha, lo cual repercute en un mejor precio de la fruta de exportación.

La cereza, es apetecido en el mundo por su llamativo color, gran contenido de sólidos solubles y su contenido de antioxidantes en su pulpa y piel, dentro de los principales compuestos antioxidantes se encuentran las antocianinas, las cuales otorgan el color característico rojo a la cereza (Liu et al., 2011)., además de otros compuestos fenólicos con características antioxidantes presentes en la fruta. Los compuestos fenólicos más relevantes presentes en las cerezas son ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico y compuestos flavonoides, grupo dentro del cual pertenecen las ya mencionadas antocianinas además de otros compuestos como flavonoles y flavonas, entre otros.

Los antioxidantes pueden ser determinados a través de una estimación bioquímica total, teniendo el valor de la cantidad total de antioxidantes por gramo de fruta. También pueden ser estimados de manera cualitativa y cuantitativa mediante procesos de separación por cromatografía líquida, siendo la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés), una de las herramientas más sofisticadas y usadas para separar y estimar algunos compuestos específicos dentro de una muestra (Tsao y Yang, 2003).

1.1 Hipótesis

El cultivo de cerezos cv 'Santina' bajo cobertores antilluvia y macrotúneles plásticos afectará la concentración de pigmentos y compuestos antioxidantes en la fruta, dada la modificación ambiental que producen.

1.2 Objetivo General

Identificar compuestos fenólicos predominantes en cerezas cv 'Santina' bajo ambientes modificados vs sin modificación.

Evaluar el efecto de modificación ambiental en capacidad antioxidante de la fruta.

Evaluar el efecto de cubiertas antilluvia en la pigmentación de los frutos.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Situación actual del cerezo

El principal productor de cerezo es Turquía, con un 20,7% de la producción mundial, seguido por Estados Unidos con un 16,4% y desde muy lejos Chile en un sexto lugar, con un porcentaje de producción mundial de tan solo un 4,6%. En términos de volumen, la demanda de cereza para el año 2014 fue de 424 mil toneladas (ODEPA, 2015). Sin embargo, la temporada 2017/2018 Chile alcanzó el récord histórico nacional de exportación de cerezas, llegando a las 185.200 toneladas de fruta; siendo China el principal país comprador, importando el 84,7% de la producción total nacional (ODEPA, 2019). El segundo mercado de destino de las cerezas chilenas corresponde a Estados Unidos, exportándose para la temporada 2017/2018 cerca de 7.612 t de fruta fresca hacia este destino.

En cuanto a la superficie nacional, esta bordea las 38.000 ha catastradas por organismos oficiales para el 2019. La Región del Maule es la que posee la mayor superficie plantada, con 17.650 ha, seguido por la Región de O’iggins y la del Bio-Bio, con 13.700 y 2.140 ha, respectivamente (ODEPA-CIREN, 2019). En cuanto a las nuevas plantaciones realizadas estas se han ido realizando cada vez más al sur del país, para lograr tener fruta de cosecha más tardía, optando por zonas de la Región de La Araucanía.

En lo que respecta a las variedades con mayor predominancia en la sexta región son ‘Lapins’ con 1.912 ha y ‘Santina’ con 1.820 ha (ODEPA-CIREN, 2018). Mientras que las variedades más presentes en la región del Maule caben destacar a Bing como la variedad más plantada, con un 57% de la superficie de la región, seguida por Lapins, la cual tiene un 36% de la superficie plantada (ODEPA, 2017). Además, cabe mencionar que los porcentajes de participación mencionados en la Región del Maule se refiere a huertos en plena producción.

2.2 Características del fruto

Botánicamente, el fruto corresponde a una drupa carnosa redondeada e incluso globosa, con una piel adherida a la pulpa, esta piel puede ser de color rojo, negro o incluso amarillo en variedades bicolor como ‘Rainier’ (INIA,2012). El color rojo característico de este fruto se debe a las concentraciones de antocianinas presentes en él, lo que permiten tener como principal

indicador de madurez la coloración de la drupa (Gao y Mazza, 1995), junto a la concentración de sólidos solubles (SS) y la firmeza, ya que el desarrollo de color dependerá del cultivar, condiciones de crecimiento, temperaturas e incluso de las condiciones de almacenaje en postcosecha (Gonçalves et al., 2007).

La cereza destaca por su color, firmeza y un equilibrado balance entre dulzor y acidez. En cuanto a los SS, la fructosa y la glucosa son los principales azúcares presentes en el fruto y el ácido málico como principal ácido orgánico (Ferretti et al., 2010).

2.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos sintetizados a partir del metabolismo secundario de las plantas, dentro de los cuales los principales compuestos en cerezo son antocianinas y polifenoles (Gao y Mazza, 1995). Estos antioxidantes no se distribuyen de igual manera en el fruto, difiriendo en concentraciones entre la piel y la pulpa; siendo la piel el tejido que más compuestos antioxidantes contiene debido a las funciones fotoprotectoras que ejerce a parte de la consecuente pigmentación (Tomás-Barberan et al., 2001).

Los fenoles presentes en cerezas incluyen antocianinas, destacando cyanidin-3-rutinosido y cyanidin-3-glucosido; flavan-3-ols tales como catequina, epicatequina y procianidinas poliméricas; flavonoles como kaempferol-3-rutinosido, quercetina-3-rutinoside y quercetina-3-glucosido (Blando y Oomah, 2019); además de compuestos no flavonoles como la hidroxicianamida y ácido hidroxibenzoico (Mozetic et al., 2006).

En algunas variedades rojas como 'Bing', las antocianinas están presentes tanto en la piel y pulpa del fruto, sin embargo, en variedades bicolor como 'Rainier', estos compuestos se encuentran restringidos solo a la piel de las cerezas y en menor concentración (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004).

Además de los efectos beneficiosos de los antioxidantes para las plantas, al ser integrados en la dieta humana, otorgan efectos beneficiosos para la salud, dentro de los cuales destacan la reducción de enfermedades degenerativas, enfermedades cardiovasculares e incluso cáncer y otras patologías cuyo origen es producto del estrés oxidativo dentro del organismo humano (Ames et al., 1993).

2.4 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

Para detectar y cuantificar los compuestos fenólicos específicos se utilizan técnicas cromatográficas de precisión, como la cromatografía líquida de alta eficacia (*High-performance liquid chromatography*, HPLC). El equipo detecta los compuestos por medio de un detector con arreglo de diodos (*Diode-Array Detection*, DAD), el cual es capaz de detectar compuestos a longitudes de onda del espectro visible y ultravioleta (UV). Los metabolitos secundarios son separados de las alícuotas de las muestras por medio de las fases móviles que interactúan con la fase fija (columna de retención) a una temperatura y presión específica antes de llegar al detector DAD (Tsao y Yang, 2003).

Escarpa y González (2000), desarrollaron métodos de separación de compuestos fenólicos en HPLC mediante el uso de una fase móvil conformada por ácido fosfórico 0,01 M y otra conformada en un 100% de metanol como solvente. A través de un detector de radiación de espectro UV y visible identificaron las antocianinas a 530 nm y a 280 nm para el caso del resto de los fenoles.

2.5 Uso de cobertores plásticos y túnel

La partidura o *cracking* es uno de los principales problemas en la producción de cerezas, este fenómeno ocurre durante las últimas semanas cercanas a cosechas (Sekse, 1995) y por lo general se debe a la exposición de agua libre sobre la superficie del fruto, ingresando esta agua hacia el fruto y generando micro partiduras en la cutícula (Knoche y Peschel, 2006), aunque también se puede deber a la absorción rápida de agua desde el suelo a través del sistema radical hacia el fruto (Balbontín et al., 2013). La susceptibilidad al *cracking* depende del nivel de madurez del fruto, número de frutos, tiempo de exposición a la lluvia, portainjerto y variedad, entre otros (Measham et al., 2009; Measham et al., 2014; Simon, 2006).

Debido a las repentinas lluvias primaverales, que ocurren cercanas a cosechas y la necesidad cada vez mayor de adelantar los periodos de recolección de los frutos, se han desarrollado prácticas que permiten la protección y modificación del ambiente en el cual se desarrolla el cultivo.

Dentro de las opciones de manejo que se han estado evaluando en Chile destacan el uso de cubiertas plásticas de polietileno, tanto el diseño de techos con cubiertas que brindan protección frente a la partidura por lluvia, como así también los diseños de túneles altos que brindan mejores

condiciones de temperatura y también permiten proteger en caso de eventuales lluvias y algunos tipos de heladas.

El uso de túneles altos aumenta la cantidad de días grados acumulados (GDD), disminuye la velocidad del viento dentro del túnel y además genera una disminución de la radiación bajo la cubierta plástica, pudiendo llegar a generar problemas de cuaja debido a la disminución en la actividad de abejas (*Apis mellifera*) bajo esta estructura (Lang, 2014).

Por otra parte, el uso de cubiertas simples ha demostrado generar un efecto beneficioso en la disminución de *cracking* en la fruta. Además, se han observado un mayor crecimiento vegetativo de los árboles bajo cubierta, reducción de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) entre un 20 y 40%, anticipo de floración en casi 15 días, así como también la anticipación de cosecha entre 1 y 2 semanas (Blanke y Balmer, 2008; Wallberg y Sagredo, 2014), resultado similar al encontrado por Lang (2014), en su estudio realizado bajo túneles altos.

Wallberg y Sagredo (2014), con respecto a la madurez, mencionan que las cubiertas plásticas desplegadas durante el inicio de coloración de los frutos que representa al estado fenológico de envero o pinta, en el cual, también los frutos comienzan a acumular SS, la coloración se vio disminuida y alto porcentaje de frutos de la parte alta y baja del árbol mostraron una reducción en el color de cubrimiento.

3. MATERIALES Y METODO

3.1 Localización y antecedentes de la zona

El ensayo se realizó en el Huerto Santa Carmen de la empresa Inés Escobar S.A., en la comuna de Sagrada Familia, Región del Maule, Chile (35°01'41.7" S 71°26'50.6" W).

El suelo pertenece a la serie La campana (LCA), la cual se caracteriza por ser de origen sedimentario, profundo, con textura que varía desde franco limosa en la superficie, hasta franco arcillo limosa en profundidad (Rojas, 2005).

El clima característico de la zona es mediterráneo, con una pluviometría para el año 2017 de 455 mm, mientras que para el año 2018 la pluviometría fue de 355 mm (Agroclima, 2019).

3.2 Diseño experimental y toma de muestras

El diseño del experimento se ejecutó completamente al azar entre árboles con similar vigor, en función del área de sección transversal del tronco y número de ramas. El material vegetal estudiado corresponde a frutos de cerezo del cultivar 'Santina' en tres condiciones: aire libre (T_0), bajo cubiertas plásticas (T_1) y bajo macro-túnel (T_2).

El cultivar en estudio, esta injertado sobre portainjerto Colt y el año de plantación corresponde al 2012. El marco de plantación para los 3 tratamientos es de 4 x 2,2 m., con una densidad de 1.136 plantas por hectárea. En cuanto a la orientación de plantación es este-oeste y los árboles están en sistema de conducción en *Kym Green Bush* (KGB) el cual se caracteriza por tener entre 20 y 24 ramas erectas finales (Tapia, 2017), sin ramificaciones, con producción de fruta solo en dardos.

Se tomaron aproximadamente 5 kg de fruta por tratamiento, posteriormente se seleccionaron 50 frutos homogéneos y se agruparon en 5 repeticiones, con 10 frutos por repetición, de los cuales se tomaron 4 frutos por repetición para realizar las evaluaciones bioquímicas.

La fecha de recolección corresponde a la cosecha comercial de cada tratamiento, las cuales se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 3.1 Fechas de cosecha de cereza cultivar ‘Santina’ con diferentes tratamientos. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule, temporada 2018-2019.

Tratamiento	Fecha de cosecha
T ₀	03 de diciembre
T ₁	29 de noviembre
T ₂	19 de noviembre

Además, la fruta fue almacenada en cámaras de frío convencional durante 30 días y fue evaluada nuevamente, las condiciones de almacenaje fueron a una temperatura de 0-1 °C con un 90% de humedad relativa.

3.3 Materiales y tipo de estructura implementado en sistemas de cubiertas plásticas

El material utilizado para la cubierta plástica a dos aguas correspondía a un polietileno de alta densidad (HDPE) entramada y el espesor de dicho polietileno era de 250 µm. En cuanto a la estructura de soporte, se utilizaron postes de madera y alambres, con sistemas manuales de plegado/desplegado de las cubiertas. La altura máxima era de 4 m en el centro, y el ancho de cada lado de la cubierta abarcaba aproximadamente 4 m.

Por otra parte, el sistema de macro túnel, utilizado como sistema de protección fue un polímero continuo de alta densidad (HDPE) de 150 µm de espesor. La estructura de soporte estaba conformada por un arco metálico y por pilares también metálicos que sostenían dicho arco. La totalidad de la estructura está cubierta con el polietileno, ya sean paredes y arco. Esta estructura tenía una altura máxima de 4,5 m, una anchura de 8 m, y 12 m de longitud.

3.4 Concentración de pigmentos

3.4.1 Antocianinas totales

Se implementó el método modificado por Fuleki y Francis (1968), el cual se basa en realizar una extracción de compuestos hidrosolubles en un medio ácido. Para la extracción de pigmentos rojos, se obtuvo 1 disco de piel por fruto con un sacabocados N° 7 de las zonas laterales, el cual fue depositado en un tubo Eppendorf, después de haber sido finamente troceado con un bisturí. Se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento.

Posteriormente los discos de piel se maceraron a 4 °C durante 24 h en una solución aforada a 500 µL conformada por etanol (96%) y HCl (1,5 N). Luego de la maceración, el extracto fue sonificado durante 5 minutos y posteriormente agitado en un agitador magnético por 5 min adicionales. A los discos de la primera extracción se les volvió a realizar un segundo lavado. El eluyente final (extracto día 1 + extracto día 2) se le midió la absorbancia (A) a una longitud de onda de 533 nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 Merck.

3.4.2 Clorofila a, b y carotenoides

La concentración de estos pigmentos se determinó a través del método propuesto por Lichtenhaler (1987), el cual se basa en la extracción de compuestos liposolubles en un solvente orgánico. Para obtener el tejido de las cerezas se realizó el mismo procedimiento que para la extracción de antocianinas. Los discos de piel se obtuvieron con un sacabocados N° 7, y se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento.

Los discos de piel fueron depositados en un tubo Eppendorf, en el cual se adicionó 500 µL de acetona al 80% y fueron macerados durante 24 h a 4°C, posteriormente el extracto fue lavado con 500 µL de acetona al 80 %, nuevamente. Posterior a esto se procedió a un sonificado durante 5 min y llevados a agitador magnético durante 5 min adicionales. Finalmente, se midió la A a 470 nm (clorofila a), 647 nm (clorofila b) y 663 nm para los carotenoides.

3.5 Preparación de extracto fenólico para la determinación de FT, ORAC y HPLC

El extracto se obtuvo a partir de la parte comestible del fruto (piel + pulpa) los cuales fueron triturados en un mortero con nitrógeno líquido y se le adicionaron 20 mL de etanol al 80%. Posteriormente se realizó una homogenización del extracto a través de un baño de ultrasonidos durante 5 minutos, luego fue llevado a una agitación magnética, para luego llevarlo a baño maría a 100 °C durante 10 min. Luego, el extracto se vertió en una probeta y se aforó hasta los 10 mL con etanol (80) y se almacenó en frío a – 80 °C hasta posteriores análisis.

3.5.1 Fenoles Totales (FT)

Se determinó el contenido total de fenoles a través del método de Coseteng y Lee (1987), el cual se basa en la capacidad que tienen los compuestos fenólicos para reducir al complejo

molibdeno (Mo) tungstato (Mo VI a Mo V) presente en el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual cambia de color durante la reacción.

Debido a que es un reactivo oxidable e inestable a través tiempo, se necesitó realizar una curva de calibración mediante el uso de ácido clorogénico, con diferencias de 25 µL entre los distintos puntos de la curva de calibración, las cuales fueron aforadas hasta los 500 µL con etanol al 50%.

Las muestras se prepararon con 10 µL del extracto fenólico y 490 µL de etanol al 50%, además se le adicionaron 2,5 mL de agua destilada y 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Posterior a esto se homogenizaron en un Vortex Mixer durante 1 a 3 segundos y se dejaron reposar durante 5 min para luego añadirle 0,5 mL de Na₂CO₃ con 2,5 mL de agua destilada. Finalmente, se midió la absorbancia a 640 nm.

3.5.2 Actividad Antioxidante a través del método ORAC

La actividad antioxidante se determinó mediante la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) en los extractos de los diferentes tratamientos, siguiendo el método de Prior (2003) y Huang (2002). Este se basa en la capacidad de reducir la reactividad del radical libre peróxido oxidativo, el cual se ve reflejado por una disminución de su fluorescencia, la cual se lleva a cabo por la acción de un estándar radical (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) di-hidrocloruro; AAPH) sobre un estándar fluorescente.

La preparación de los estándares se realizó a partir de una masa de 0,1624 g de estándar radical (AAPH) que fue disuelto en una solución de 4 mL de tampón fosfato (pH 7,4) y de 10 µL de fluoresceína sódica (estándar fluorescente) que fueron disueltos en 10 mL de tampón fosfato (pH 7,4). Dado que la fluorescencia de este reactivo es variable, se realizó una curva de calibración con concentraciones que variaron entre 6,5 y 100 µM de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) ajustado en tampón fosfato a pH 7,4.

Luego de realizar la curva de calibración y preparar los estándares requeridos se analizaron los extractos mediante el equipo Biotek Synergy HT.

3.6 Separación e identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC

Los compuestos fenólicos fueron identificados y caracterizados mediante el método modificado por Hayaloglu y Demir (2016), en el cual los extractos se mezclan a través de dos fases móviles y son guiadas hasta el interior de una columna Kromasie 100-5C18 (250 x 4,6 mm). La composición de las fases fueron las siguientes: i) fase A; formado por agua, ácido fórmico y acetonitrilo en proporciones 92:5:3 respectivamente (v/v), mientras que ii) la fase B se compone de igual manera, pero en proporciones 45:5:50 (v/v). El gradiente utilizado fue: 3% de B al inicio hasta subir al 10% a los 15 min, luego desde 10 hasta 25% durante 10 min. Posteriormente se incrementó de 25 a 30% en el transcurso de 10 min más; luego pasó de 30 a 50% durante 5 min y desde 50 hasta 60% en el transcurso de 3 min manteniéndose en esta condición. Finalmente, el gradiente de la fase B decreció a la condición inicial a los 60 min.

La detección se realizó mediante el detector de radiación UV-VIS (DAD) a 4 longitudes de onda distinta; 280, 320, 360 y 520 nm. Los compuestos fenólicos y en especial las antocianinas fueron comparados con los peaks del área graficada de cada estándar.

Para determinar el compuesto fenólico predominante en las muestras, en este caso Cyanidin-3-rutinosido, se realizó la cuantificación de fenoles a través del método del patrón interno, el cual consiste en utilizar un compuesto de naturaleza similar al analito en estudio, pero que no esté presente en la muestra (Fernández y García). En este caso, el compuesto usado como patrón interno correspondió a Cyanidin-3-arabinosido.

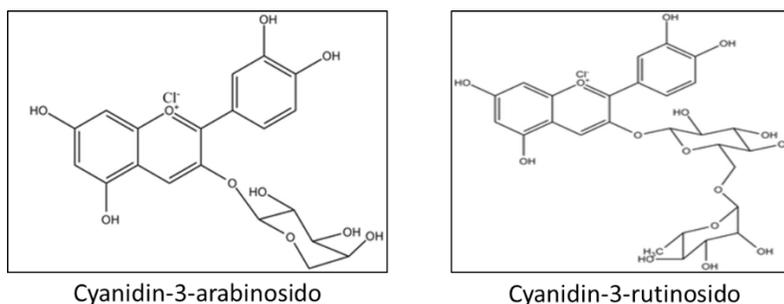


Figura 3.1 Estructura química de Cyanidin-3-arabinosido y Cyanidin-3-rutinosido.

Posteriormente se procede a preparar una serie de diluciones con concentraciones crecientes del compuesto en estudio (Cyanidin-3-rutinosido) en conjunto de una concentración fija del patrón interno (Cyanidin-3-arabinosido), tal y como se muestra a continuación:

Cuadro 3.2 Curva de calibración para cuantificación de Cianidin-3-rutinosido.

Dilución 1: 500 µL Cy3Rut (500 ppm) + 500 µL Cy3Arab (200 ppm)
Punto curva calibración 1: 250 ppm Cy3Rut + 100 ppm Cy3Arab
Dilución 2: 500 µL Cy3Rut (400 ppm) + 500 µL Cy3Arab (200 ppm)
Punto curva calibración 2: 200 ppm Cy3Rut + 100 ppm Cy3Arab
Dilución 3: 500 µL Cy3Rut (300 ppm) + 500 µL Cy3Arab (200 ppm)
Punto curva calibración 3: 150 ppm Cy3Rut + 100 ppm Cy3Arab
Dilución 4: 500 µL Cy3Rut (150 ppm) + 500 µL Cy3Arab (200 ppm)
Punto curva calibración 4: 75 ppm Cy3Rut + 100 ppm Cy3Arab
Dilución 5: 500 µL Cy3Rut (75 ppm) + 500 µL Cy3Arab (200 ppm)
Punto curva calibración 5: 37,50 ppm Cy3Rut + 100 ppm Cy3Arab

Luego de inyectar 20 µL de muestra de las diferentes soluciones en el cromatógrafo, se obtuvieron las diferentes áreas del compuesto a distintas concentraciones, además del área del patrón interno a concentración constante.

La relación entre el área del compuesto y del patrón permite obtener distintos puntos según la concentración del compuesto y poder generar una curva de calibración y su posterior ecuación de la recta para determinar la concentración de cianidin-3-rutinosido en las muestras, usando el área de este compuesto del cromatograma con lectura de 520 nm, para poder cuantificar a través de la ecuación obtenida en la curva de calibración.

Ecuación de la recta: $y = 0,7383x + 0,171$

$$\text{Concentración de Cianidin} = \frac{(\text{Área analito}/\text{Área patrón interno}) - 0,171}{0,7383} \times 100$$

Los estándares para la cuantificación se obtuvieron de la empresa Merck (Darmstadt, Germany).

4. RESULTADOS

4.1 Pigmentos

4.1.1 Antocianinas totales

Las concentraciones de antocianinas totales mostraron diferencias significativas respecto al control tal como se muestra en el **cuadro 4.1**. El contenido más alto de este pigmento se encontró en los frutos cultivados bajo condiciones de control (269 mg/100 g PF), por otra parte, la concentración menor fue en los frutos que se desarrollaron bajo cubierta (119 mg/100 g PF), en cuanto al tratamiento bajo túnel, este demostró tener concentraciones estadísticamente similares al tratamiento control y al tratamiento bajo cubierta (182 mg/100 g PF).

Estos resultados fueron similares a los encontrados por Overbeck (2017), en el cual, el cultivar 'Samba' demostró tener mayores concentraciones de antocianinas en condiciones de control al ser una variedad temprana como 'Santina'. Sin embargo, en el mismo ensayo también se estudiaron cultivares de media estación: 'Bellise' y 'Rita'; teniendo ambos, concentraciones de antocianinas significativamente mayores en condiciones de cultivo bajo cubiertas.

Cuadro 4.1 Concentración pigmentos en cerezo variedad 'Santina' bajo ambientes protegidos a inicio de cosecha comercial. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule, temporada 2018-2019.

Tratamiento	Clorofila a (mg/100 g PF)	Clorofila b (mg/100 g PF)	Clorofilas Totales (mg/100 g PF)	Carotenoides Totales (mg/100 g PF)	Antocianinas Totales (mg/100 g PF)
T ₀	0,77 a	2,2 a	2,9 a	4,4	269 a
T ₁	0,60 a	1,5 a	2,1 a	3,1	119 b
T ₂	2,85 b	5,8 b	8,7 b	3,6	182 ab
Significancia	**	**	**	n.s	*
Valor P	0,00	0,00	0,00	0,38	0,04

Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según test HSD de Tukey.

n.s = no significativo, * =significativo ($\leq 0,05$); **= altamente significativo ($p \leq 0,01$)

Otro ensayo también realizado en cultivares tempranos: 'Samba', 'Souvenir' y 'Prime Giant'; cultivados bajo cubierta demostraron tener concentraciones mucho mayores en los frutos bajo cubierta que aquellos cultivados de manera tradicional. Para el caso de los 3 cultivares en estudio, los autores concluyen que el efecto combinado de baja intensidad de luz y altas fluctuaciones de

temperatura entre el día y la noche induce un estrés térmico en la planta, favoreciendo la síntesis de compuestos fenólicos (Schmitz-Eiberger y Blanke, 2012).

Estos resultados refuerzan la idea que la síntesis de compuestos fenólicos está determinada por factores varietales y condiciones microclimáticas ya que las diferencias encontradas en nuestro ensayo pudieron haberse debido a las condiciones microambientales que sufrieron modificaciones por el efecto de los tratamientos. Por ejemplo: uno de los aspectos más notorios que se vio afectado fue la radiación UV-B, la cual disminuyó en un 46% en el tratamiento bajo cubierta y un 98% en el tratamiento bajo túnel, respecto al control (Sánchez, 2019).

En las manzanas, la radiación UV-B tiene un gran efecto en la estimulación de la formación de pigmentos (Arakawa, 1988), sin embargo, se ha visto que para el caso de las cerezas, dicho estímulo no sería el principal responsable de promover la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa, la cual está asociada a la síntesis de compuestos fenólicos (Overbeck et al., 2017), ya que si bien hubo una disminución de antocianinas en el tratamiento de túnel, este tuvo una reducción mucho mayor de radiación UV comparado con la cubierta plástica, la cual mostró tener la concentración de antocianinas más baja de los 3 tratamientos, por lo cual sería correcto asumir que la radiación UV-B no influyó significativamente en la formación de las antocianinas en las cerezas.

Otro componente ambiental que sufrió más modificaciones fue la temperatura, la cual para el tratamiento control mostró una temperatura media de 19 °C al igual que en el tratamiento bajo cubierta, en contraste con el tratamiento bajo túnel que tenía una media de 21 °C, durante el mes antes de cosecha comercial para cada tratamiento.

Las temperaturas máximas del tratamiento bajo túnel estuvieron, por lo general, por encima de los 30°C y hasta incluso sobrepasaron los 40°C durante el mes anterior a la cosecha (**Figura 4.1**), lo cual puede haber generado un efecto negativo en el proceso de formación de antocianinas, ya que la síntesis de fenoles es llevada a cabo por la acción de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL), la cual es dependiente de la temperatura, la intensidad y el espectro de radiación (Solovchenko y Shmitz-Eiberger, 2003).

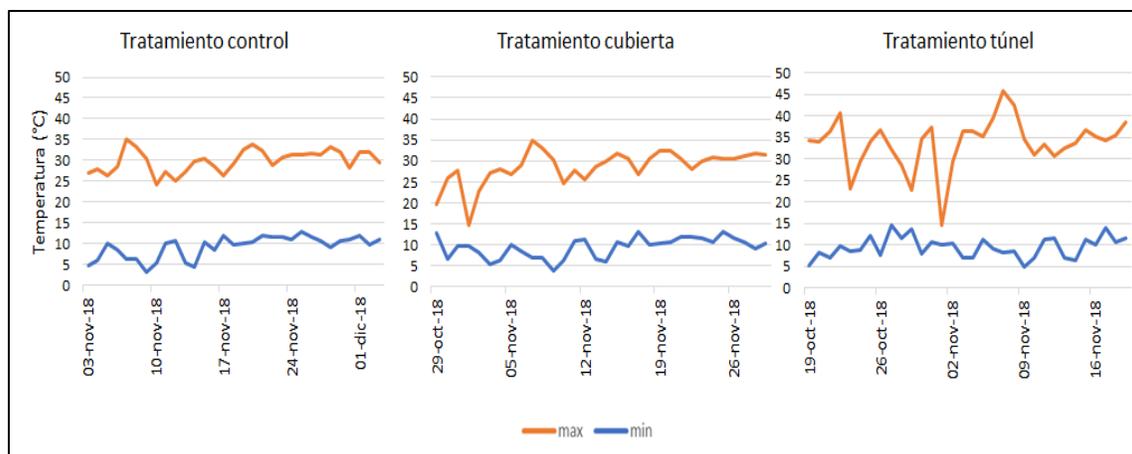


Figura 4.1 Temperaturas máxima y mínima de noviembre (30 d antes de cosecha) en tratamiento control, cubierta y túnel. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule. Temporada 2018-2019.

Otro aspecto para considerar fueron las temperaturas mínimas del último mes antes de cosecha (noviembre) ya que este periodo tiene un importante efecto en la coloración del fruto, ya que la síntesis de antocianinas en cerezas es mayor durante las últimas etapas del desarrollo del fruto, desde pinta en adelante (Serrano et al., 2005), además noches con temperaturas bajas durante este periodo permite que se utilicen menos carbohidratos durante la respiración y, por lo tanto pueden ser destinados como sustratos para la formación de compuestos del metabolismo secundario como las antocianinas (Iglesias et al., 2005). Antecedentes en manzanas indican que la coloración de frutos se ve favorecida por temperaturas nocturnas entre 7 y 10°C, indicando que bajas temperaturas permiten una mayor acumulación de carbohidratos en la epidermis del fruto (Creasy, 1969).

Durante este ensayo las temperaturas nocturnas (temperaturas mínimas) estuvieron por lo general cercanas a los 10-12°C en las tres condiciones de cultivo (**Figura 4.1**), reforzando la idea que las temperaturas máximas provocaron el efecto decisivo en la síntesis de antocianinas.

Para el caso del tratamiento control, las condiciones de temperatura durante el mes anterior a la cosecha comercial tuvieron una menor oscilación térmica entre las temperaturas diurnas y nocturnas, otorgando un ambiente más estable y con mejores condiciones para una correcta síntesis de antocianinas. Luego, el tratamiento bajo túnel seguido por unas mayores temperaturas máximas, en el mismo periodo, podría haber provocado una mayor síntesis de este pigmento, aunque dichas diferencias también podrían haberse debido a la menor carga frutal obtenida en los árboles bajo este tratamiento, ya que por problemas en el interior del túnel durante la

polinización con los vectores entomófilos, se generó una diferencia de rendimiento entre el tratamiento control al aire libre (7.000 kg/ha) y el túnel (700 kg/ha) de hasta diez veces menor. En cuanto al tratamiento de cubierta convencional (5.700 kg/ha), su menor formación de antocianinas podría haber estado influido por temperaturas máximas menores durante el mes antes de cosecha en comparación con las temperaturas máximas del tratamiento túnel en el mismo periodo, ya que el viento ayudó a mitigar el exceso de acumulación térmica que sufrieron los cerezos de la cubierta.

Después de 30 días en almacenaje, las concentraciones de antocianinas aumentaron significativamente solo en el caso del tratamiento túnel, en el cual el aumento fue de un 44,5% con respecto al mismo tratamiento en fecha de cosecha comercial (**Figura 4.2**).

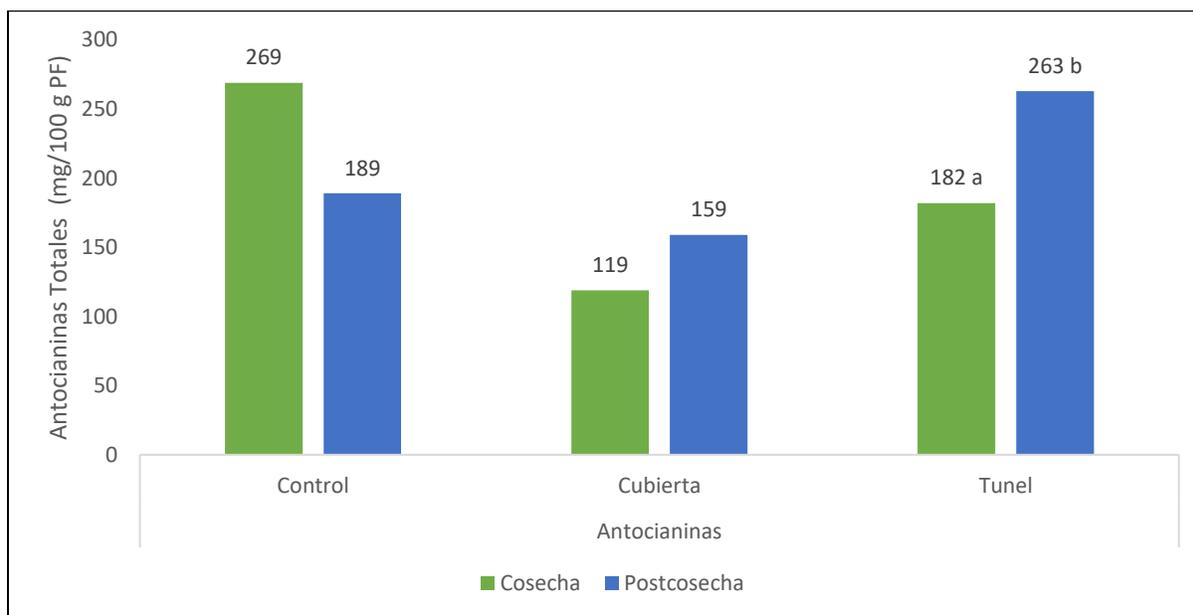


Figura 4.2 Concentración de antocianinas (mg/100 g PF) en cerezas ‘Santina’, al aire libre (control), bajo cubierta y túnel en fecha de cosecha comercial y después de 30 d de almacenaje en cámaras de frío convencional a ~0 °C y ~90% de HR.

En cuanto al tratamiento bajo cubierta, las variaciones no fueron significativas, aunque se observa una tendencia al aumento de antocianinas durante el tiempo de almacenaje.

Para el caso del tratamiento control, este mostró tener una tendencia a la disminución en la concentración, aunque dicha variación no fue significativa. Estos datos difieren de la mayoría de

los resultados de otros autores, ya que en general las concentraciones de antocianinas después de almacenaje aumentan tanto en condiciones de temperatura ambiente como también en almacenaje en frío (Gonçalves et al., 2004).

Gonçalves et al., (2007) señala que las antocianinas pueden llegar a aumentar hasta el 50% del total de fenoles en cerezas, en el mismo estudio también señala que se pueden encontrar situaciones donde se ven disminuidas las concentraciones de antocianinas presentes en la fruta debido a la copigmentación, la cual es una interacción ocurrida entre una antocianina y otros compuestos tales como flavonoides, ácidos orgánicos o incluso otras antocianinas (Mazza y Brouillard, 1990) , estas reacciones suelen darse a pH bajo, usualmente entre 3 y 5 (Brouillard et al., 1991) dentro de la fruta y es beneficiada con temperaturas bajas (Baranac et al., 1996).

4.1.2 Clorofilas

Las concentraciones de clorofilas evaluadas corresponden a las concentraciones de clorofila a, clorofila b y clorofilas totales para los 3 tratamientos.

Los contenidos de clorofilas a, demostraron ser significativamente diferentes entre tratamientos (**Cuadro 4.2**). Por una parte, la concentración mayor se obtuvo en los frutos cultivados bajo túnel, tal efecto se puede deber a que la transmisión de la radiación disminuyó en un 98% comparado con el control, por ende, la cantidad de clorofilas degradadas fueron menores, ya que la radiación UV-B tiene efectos fotooxidativos en las clorofilas, debido a la alta energía transmitida por este tipo de onda hacia los cloroplastos generando degradación de proteínas y desorganización de los centros de reacción (Carrasco-Ríos, 2009). En cambio, para el contenido de clorofila a en los frutos bajo cubierta, este no mostró tener diferencias significativas frente al control debido a que la disminución de la radiación UV-B no fue tan abrupta como en el caso anterior.

En cuanto a las concentraciones de clorofila b, este mostro tener un comportamiento similar al de clorofila a, siendo el tratamiento túnel el de mayor concentración y lo que respecta al tratamiento de cubierta, este no demostró ser diferente estadísticamente del control.

En el caso de las clorofilas totales, esta demostró ser diferentes estadísticamente entre los tratamientos, siendo los frutos bajo túnel los que lograron tener una mayor concentración (**Cuadro 4.1**), en el caso del tratamiento bajo cubierta y control, fueron estadísticamente similares entre sí.

En cuanto a las evaluaciones realizadas después de la salida de almacenaje, para el caso de la concentración de clorofila a, solo mostró un aumento significativo en el tratamiento control (**Figura 4.3**), mientras que el en tratamiento cubierta y túnel tan solo se observaron tendencias al aumento sin ser estadísticamente significativos.

En cuanto a clorofila b, también se vio un aumento significativo en el tratamiento control, y tendencias al aumento en el resto de los tratamientos.

En relación con la concentración de clorofilas totales luego de almacenaje, tan solo hubo un aumento significativo en el caso del tratamiento control (**Figura 4.3**). Para el caso del tratamiento bajo cubierta y túnel también sufrieron aumentos en sus concentraciones, aunque estas no fueron significativas.

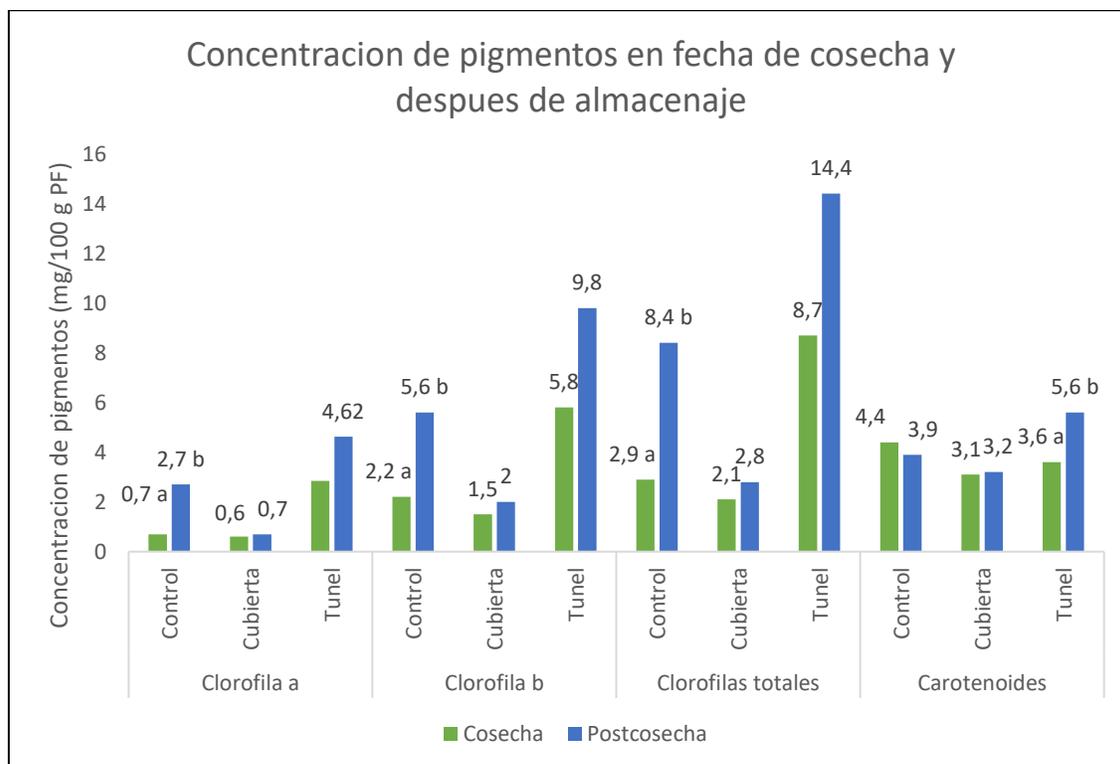


Figura 4.3 Concentración de clorofilas y carotenoides en frutos bajo tratamiento control, bajo cubierta y túnel en fecha de cosecha comercial y después de 30 días de almacenaje.

4.1.3. Carotenoides

Con lo que respecta a las concentraciones de carotenoides, estas no fueron significativamente diferentes entre los 3 tratamientos (**Cuadro 4.1**), sin embargo, se observa una tendencia a una mayor concentración en el tratamiento control y una menor concentración en el tratamiento bajo cubierta, resultado similar al encontrado en el cultivar 'Samba', en donde el tratamiento control obtuvo concentraciones significativamente mayores frente al tratamiento bajo cubierta. (Overbeck, 2017).

En cuanto respecta a las evaluaciones realizadas después de la salida de almacenaje, tan solo se observaron aumentos significativos en el contenido de carotenoides en el tratamiento bajo túnel, mientras que para el tratamiento control y para la cubierta no existieron diferencias significativas (**Figura 4.3**).

4.2 Fenoles totales

El **cuadro 4.2** muestra las concentraciones de fenoles totales para los tres tratamientos medidos a fecha de cosecha comercial.

En cuanto a fenoles totales, sí existieron diferencias significativas entre los tratamientos. El contenido más alto se obtuvo en los frutos cultivados en el tratamiento bajo túnel (193 mg EAC/100 g PF) y el nivel más bajo en el tratamiento bajo cubierta (147 mg EAC/100 g PF). Con respecto al tratamiento control (177 EAC/100 g PF), este resultó ser estadísticamente similar a ambos tratamientos, evidenciándose una diferencia del 17% mayor entre el testigo y la cubierta y de un 24% menor entre el testigo y el túnel.

Kafkaletou et al., (2015) estudiaron los cultivares 'Adriana' y 'Noire de Meched' en condiciones de cultivo bajo cubiertas plásticas en Macedonia (Grecia). Los rendimientos para 'Adriana' fue de 20,1 kg por árbol, mientras que para 'Noire de Meched' el rendimiento correspondió a 17,6 kg por árbol.

En el cultivar 'Adriana', la cubierta plástica no tuvo efecto en el contenido de fenoles de los frutos en cuanto a los frutos del tratamiento control (0,73 y 0,59 g de GAE / kg PF respectivamente).

Para el caso del cultivar 'Noire de Meched' se encontraron diferencias de concentración, siendo mayor en los frutos cultivados en condiciones de control (0,76 g de GAE / kg PF) que aquellos frutos bajo cubierta plástica (0,61 g de GAE / kg PF).

Usenik et al., (2009), estudió la composición bioquímica de frutos de cerezos tardíos cultivados bajo ambiente modificado con cubiertas plásticas en los cultivares 'Kordia', 'Regina' y 'Hedelfinger'. En cuanto a las concentraciones de fenoles encontradas en el ensayo, se evidenció que no hay efecto significativo de la cubierta sobre el contenido de fenoles en la fruta.

Esta evidencia permite pensar que la síntesis de compuestos fenólicos se podría ver alterada por condiciones varietales y por los efectos microclimáticos cercanos a la fruta, en concordancia con lo expuesto por Fanaidis et al., (2010) al mencionar que la composición fenólica está determinada genéticamente y son influenciadas por factores climáticos.

Esta idea se refuerza por los resultados encontrados por Gonçalves et al., (2004) concluyendo que la cantidad de fenoles totales se ve influida por las condiciones climáticas, ya que, según lo indicado, se evaluaron la cantidad de fenoles durante dos temporadas consecutivas, mostrando resultados diferentes entre una temporada y otra.

Cuadro 4.2 Concentración de fenoles totales y capacidad antioxidante ORAC en cerezo cultivar 'Santina' bajo ambientes protegidos a inicio de cosecha comercial. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule, temporada 2018-2019.

Tratamiento	Fenoles totales (mg EAC/100 g PF)	ORAC (µmoles de ET /100 g PF)
Testigo	177 ab	4.167 a
Cubierta	147 b	3.332 b
Túnel	193 a	2.969 b
Significancia	*	**
Valor P	0,02	0.00

EAC = Equivalentes de Ácido Clorogénico

ET = Equivalentes de Trolox

Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según test HSD de Tukey

n.s = no significativo, * =significativo ($\leq 0,05$); **= altamente significativo ($p \leq 0,01$)

4.3 Capacidad antioxidante (ORAC)

Los tratamientos demostraron ser diferentes estadísticamente (**cuadro 4.2**), siendo el tratamiento en condiciones de control quien obtuvo el valor más alto de la capacidad antioxidante (4.167 μ moles de ET /100 g PF), seguido por el tratamiento cubierta y bajo túnel que resultaron ser similares entre si (3.332 y 2.969 μ moles de ET /100 g PF, respectivamente).

Los valores más elevados encontrados en la fruta en condiciones de control concuerdan con otros autores quienes concluyeron que se deben a que la mayor fuente de antioxidantes en cerezas son las antocianinas (Acero et al., 2019 y Jakovek et al., 2009), permitiendo así que tengan una mayor capacidad de protección frente a la degradación oxidativa, lo cual también ha sido apoyado por otros como Ballistreri et al., (2013) y Serra et al., (2011).

4.4. Caracterización de fenoles específicos por HPLC

A través de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), se logró separar los distintos compuestos fenólicos de las muestras (**Figura 4.4**), los cuales resultaron ser predominantemente antocianinas que fueron detectadas a 520 nm, ya que estos son los principales fenoles en cerezas (Acero, 2019), siendo cianidin-3-rutinosido la antocianina de mayor presencia en las muestras de los diferentes tratamientos. Ballistreri et al., (2013) caracterizó a cianidin-3-glucosido y cianidin-3-rutinosido como las principales antocianinas encontradas en 24 genotipos de cerezas cultivadas en Italia.

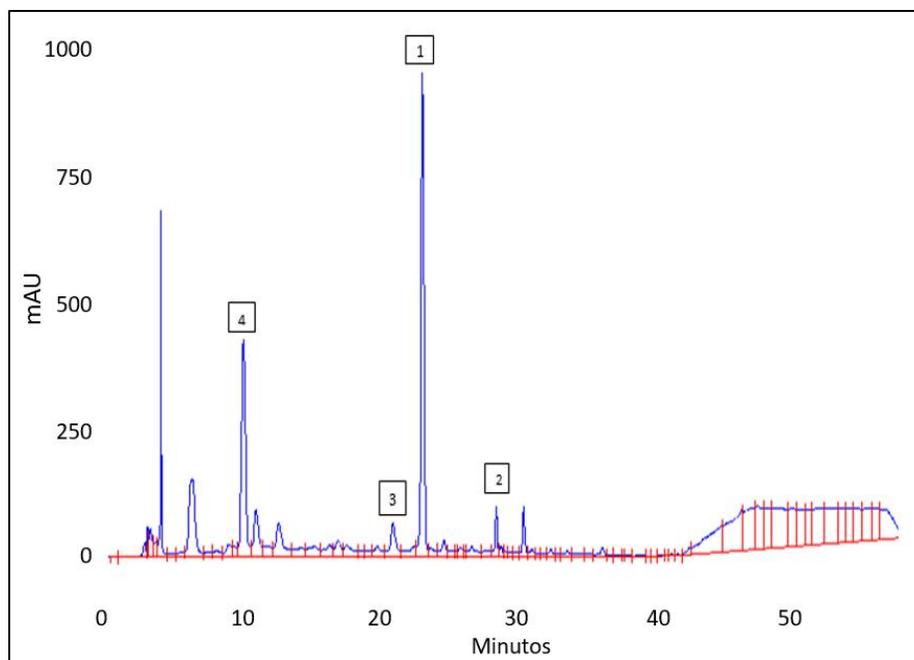


Figura 4.4 Cromatograma del extracto fenólico de cerezas. Muestra los principales compuestos identificados: 1, Cyanidin-3-Rutinosido; 2, Peonidin-3-rutinosido; 3, Cyanidin-3-glucosido; 4, Ácido coumarico.

Martini et al., (2017) también identificó a Cyanidin-3-glucosido y Cyanidin-3-rutinosido como las principales antocianinas en cerezas, seguidas de pequeñas concentraciones de peonidin-3-rutinosido y pelargonidin-3-rutinosido. Gonçaves et al., (2004) tuvieron resultados consistentes con los encontrados en nuestro ensayo, siendo de nuevo, Cyanidin-3-glucosido y cyanidin-3-rutinosido las principales antocianinas.

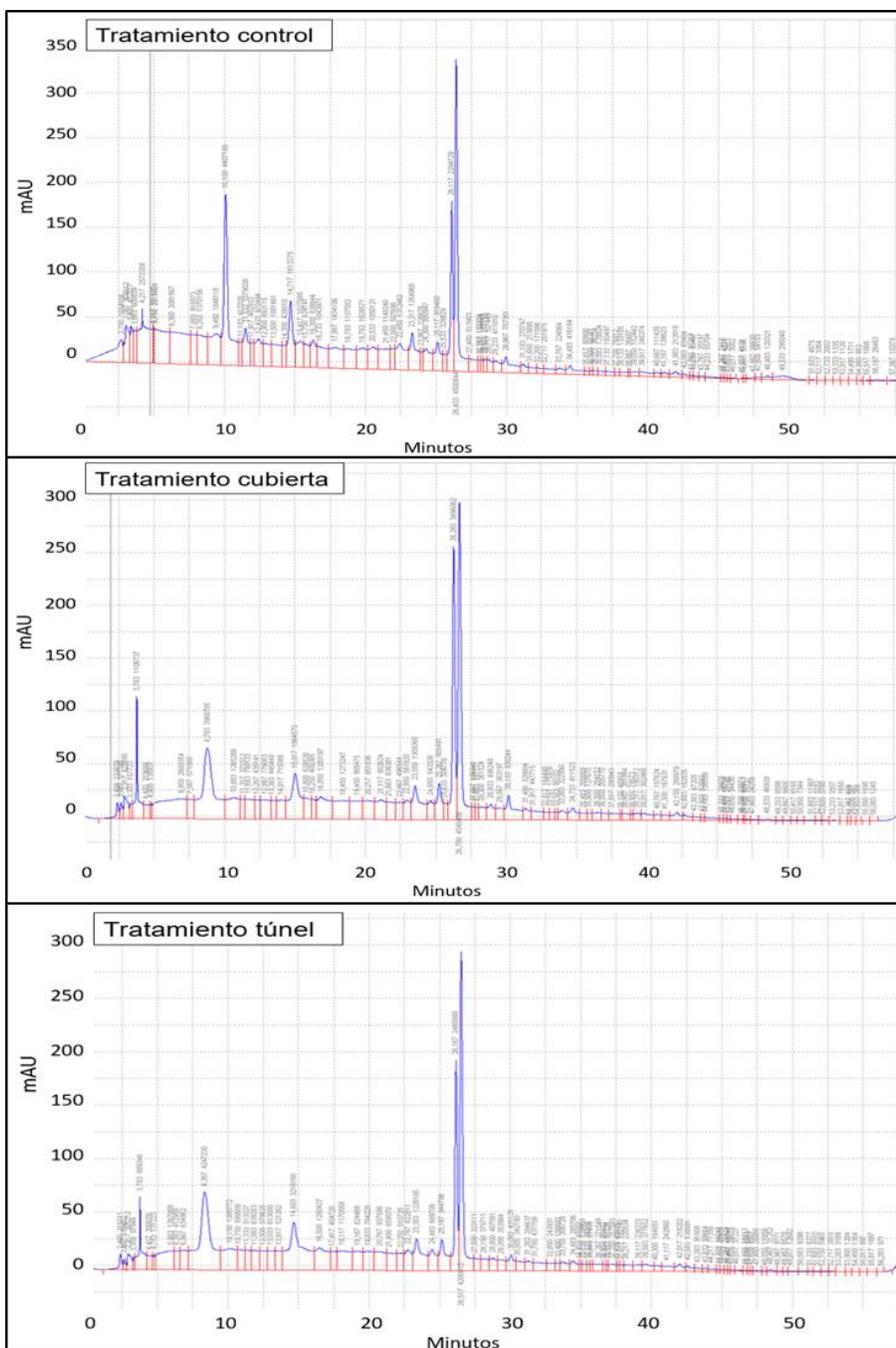


Figura 4.5 Cromatograma del extracto fenólico de cerezas cultivar ‘Santina’ en tratamiento control, bajo cubierta y túnel.

En cuanto a las concentraciones de cianidin-3-rutinosido, en el **cuadro 4.3** se muestra que las concentraciones no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, aunque las concentraciones más elevadas fueron encontradas en el tratamiento control (6,1 mg/100 g PF), seguidos por la fruta bajo cubierta (7,1 mg/100 g PF) y finalmente por la fruta bajo túnel (6,9 mg/100 g PF).

Cuadro 4.3 Concentración de Cianidin-3-rutinosido en cerezo cultivar 'Santina' bajo ambientes protegidos a inicio de cosecha comercial. Huerto Santa Carmen, Sagrada Familia, Región del Maule, temporada 2018-2019.

Tratamiento	Cyanidin-3-rutinosido (mg/100 g PF)
Testigo	6,1
Cubierta	7,1
Túnel	6,9
Significancia	n.s
Valor P	0,7

Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según test HSD de Tukey. n.s = no significativo, * =significativo ($\leq 0,05$); **= altamente significativo ($p \leq 0,01$)

Las concentraciones en general estuvieron más bajas que las reportadas por otros autores. Según Cao et al., (2015) las concentraciones en el cultivar 'Santina' están cercano a los 65 mg/100 g PF. Para el caso del cultivar 'Stella' y 'Summit', los cuales son los parentales del cultivar 'Santina', las concentraciones corresponden a 128 y 65 mg/100 g PF, respectivamente (Gao y Mazza, 1995).

5. CONCLUSIONES

El uso de cubiertas protectoras, así como también el de macrotúneles generan modificaciones ambientales alrededor de los árboles, modificando la temperatura y la radiación PAR y UV-B, así como también la formación de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas.

Se evidenciaron diferencias en pigmentos en la fruta de los diferentes tratamientos, siendo la concentración de antocianinas mayor en el caso de la fruta control. Lo mismo ocurrió en el caso de los carotenoides, aunque esta diferencia no fue significativa. En cuanto a la concentración de clorofilas, se mostraron diferencias significativas y fueron principalmente mayores en la fruta bajo túnel, posiblemente debido a la alta radiación UV filtrada (98%), disminuyendo la fotoxidación del pigmento.

Las diferencias entre los pigmentos podrían haberse visto afectadas por las diferentes cargas frutales de cada tratamiento, siendo el tratamiento control el que mostraba mayor carga frutal (7.000 kg/ha), seguido por el tratamiento bajo cubierta (5.700 kg/ha) y finalmente bajo túnel (700 kg/ha).

Las concentraciones de cianidin-3-rutinosido, cuantificado mediante HPLC, no demostraron ser diferentes entre tratamientos, aunque sus valores fueron bastantes más bajos en comparación a lo reportado por otros autores, por lo cual se necesitará revisar la metodología para próximos estudios.

Las concentraciones de cianidinas no tienen relación con los valores de antocianinas totales, ya que por ejemplo el control demostró tener una mayor cantidad de antocianinas totales, pero obtuvo la concentración más baja de cianidin-3-rutinosido, aunque ésta es la predominante en las muestras. Dicha diferencia se puede deber a que hay más antocianinas que estarían aportando a las concentraciones totales de éstas, como lo es cianidin-3-glucosido y peonidin-3-rutinosido.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acero N, Gradillas A, Beltran M, García A y Muñoz D. 2019. Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties. *Food Chemistry* 279: 260–27.

Agroclima. 2019. Estación metereológica de Sagrada Familia. Obtenido de: <http://www.agroclima.cl/InformesAgroclima/Precipitacion.aspx?IdEst=157&Infor=22Tpo=2>. Consultado el: 12 de enero del 2020.

Ames B, Schigenaga M, and Hagen T. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90: 7915-7922.

Arakawa O. 1988. Photoregulation of Anthocyanin Synthesis in Apple Fruit under UV-B and Red Light. *Plant Cell Physiol* 29: 1385-1389.

Balbontin C, Ayala H, Bastias R, Tapia G, Ellena M, Torres C, Yuri J, Quero-Garcia J, Rios J, Silva H. 2013. Cracking in sweet cherries: A comprehensive review from a physical, molecular, and genomic perspective. *Chilean J. Agric. Res.* 73: 66-73.

Ballistreri G, Continella A, Gentile A, Amenta M, Fabroni S y Rapisarda P. 2013. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chemistry*, 140: 630–638.

Baranac J, Petranovic N y Dimitric-Markovic J. 1996. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1333-1336.

Bickford R y Valverde C. 2018. Stone Fruit Annual. *Global Agricultural Information Network* 1818: 1-23.

Blando F and Oomah B. 2019. Sweet and sour cherries: Origin, distribution, nutritional composition and health benefits. *Trends in Food Science & Technology* 86: 517–529.

Blanke M y Balmer M. 2008. Cultivation of sweet cherry under rain covers. *Acta Horticulturae* 795: 479-484.

Brouillard R, Wingand M, Dangles O y Cheminal A. 1991. pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *Journal of the Chemical Society* 2:1235-1241.

Cao J, Jiang Q, Lin J, Li X, Sun C, y Chen K. 2015. Physicochemical characterisation of four cherry species (*Prunus* spp.) grown in China. *Food Chemistry* 173: 855–863.

Carrasco-Ríos, L. 2009. Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas. *Idesia Arica* 27: 59-76.

Chaovanalikit A y Wrolstad R. 2004. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of food science* 69: 67-72.

Coseteng M. & Lee C.Y. (1987). Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relations to degree of browning. *Journal of Food Science* 52: 985–989.

Creasy L. 1969. The role of low temperature in anthocyanin synthesis in 'McIntosh' apples. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 93, 716–724.

Ellena, M. 2012. Formación y sistemas de conducción del cerezo dulce. Instituto de investigación agropecuarias. Temuco, Chile. 201. Obtenido de <http://biblioteca.inia.cl/link.cgi/catalogo/boletines/39646.act>. Consultado el 04 de octubre del 2018.

Escarpa, A., y Gonzalez, M. C. 2000. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. Journal of Chromatography 897: 161–170.

Esti M., Cinquante, L., Sinesio, F., Moneta, E., Matteo, M. 2002. Physicochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage. Food Chemistry 76: 399-405.

Faniadis D, Drogoudi P y Vasilakis M. 2010. Effects of cultivars, orchards elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.). Scientia Horticulturae.125. 301-304.

Fernandez I y Garcia E. Cuantificación de compuestos por cromatografía: Método del Patrón Interno. Universidad politécnica de valencia. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16356/M%C3%A9todo%20Patr%C3%B3n%20Interno.pdf?sequence=2>. Consultado el 04 de mayo del 2020.

Ferretti G, Bacchetti T, Belleggia A y Neri D. 2010. Cherry Antioxidants: From Farm to Table. Molecules 15: 6993-7005.

Fuleki T y Francis F. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. Journal of food science 33: 266-274.

Gadow, A. Von, Joubert, E., y Hansmann, C. F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*aspalathus linearis*), r -tocopherol, bht, and bha: Journal Agricult food chem 45: 632–638.

Gao L y Mazza G. 1995. Characterization, Quantitation, and Distribution of Anthocyanins and Colorless Phenolics in Sweet Cherries. Agric Food Chem. 43: 343-346.

Gonçalves B, Landbo A, Knudsen D, Silva A, Moutinho-Pereira J, Rosa E y Meyer A. 2004. Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.) J. Agric.Food Chem. 52: 523-530.

Gonçalves B, Silva A, Moutinho-Pereira J, Bacelar E, Rosa E y Meyer S. 2007. Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.) Food chemistry 103:976-984.

Gonçalves B. 2007. Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). Food Chemistry 103: 976-984.

Hayaloglu A, Demir N. 2016. Phenolic compounds, volatiles, and sensory characteristics of twelve sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in turkey. Journal of food science 81.

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agric Food Chem* 50: 1815-1821.

Iglesias I, Salvia J, Torguet L, Montserrat R. 2005. The evaporative cooling effects of overtree microsprinkler irrigation on 'Mondial Gala' apples. *Scientia Horticulturae* 103: 267-287.

Jakobek L, Šeruga M, Voća S, Šindrak Z y Dobričević N. 2009. Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks. *Scientia Horticulturae* 123: 23–28.

Kafkaletou M, Miltiadis V, Christopoulos, Ktistakil M, Sotiropoulos T, Tsantili E. 2015. Influence of rain cover on respiration, quality attributes and storage of cherries (*Prunus avium* L). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 88: 87–96.

Knoche M y Pechel S. 2006: Water on the surface aggravates microscopic cracking of the sweet cherry fruit cuticle. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 131: 192–200.

Lang G. 2014. Growing sweet cherries under plastic covers and tunnels: Physiological aspects and practical considerations. *Acta Horticulturae* 1020: 303-312.

Lichtenthaler H. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* 148: 350-382.

Liu Y, Liu X, Zhong F, Tian R, Zhang K, Zhang X, and Li T. 2011. Comparative study of phenolic compounds and antioxidant activity in different species of cherries. *Journal Food Science* 76: 633-638.

Mazza G y Brouillard R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* 29: 1097–1102.

Measham P, Gracie A, Wilson S, Bound. 2014. An alternative view of rain-induced cracking of sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Acta Hort.* 1020: 217-222.

Measham P., Bound A. Gracie J, Wilson S. 2009. Incidence and type of cracking in sweet cherry (*Prunus avium* L.) are affected by genotype and season. *Crop and Pasture Sci.* 60: 1002-1008.

Meli T, Riesen W y Widmer A. 1984. Protection of sweet cherry hedgerows with polyethylene films. *Acta Hort.* 155: 463–467.

Mozetic B, Simcic M, Trebse P. 2006. Anthocyanins and hydroxycinnamic acids of Lambert compact cherries (*Prunus avium* L.) after cold storage and 1-methylcyclopropene treatment. *Food chem* 97: 302-309.

ODEPA. 2014. Cerezas: actualización de un mercado. Obtenido de <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2014/04/mercadoCerezas201404.pdf>. Consultado el 27 de noviembre del 2018.

ODEPA. 2015. Cerezas: frutas en expansión. Obtenido de <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2015/08/Cerezas2015.pdf>. Consultado el 28 de noviembre del 2018.

ODEPA. 2017. Boletín fruta fresca. Obtenido de <http://www.odepa.gob.cl/contenidos-rubro/boletines-del-rubro/30epende-fruta-fresca-diciembre-de-2017>. Consultado el 04 de octubre del 2018.

ODEPA. 2018. Boletín fruta fresca. Obtenido de <https://www.odepa.gob.cl/contenidos-rubro/boletines-del-rubro/30epende-de-fruta-fresca-marzo-de-2018>. Consultado el 04 de octubre del 2018.

ODEPA. 2019. Boletín fruta fresca. Febrero 2019. Obtenido de <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiaZWQ3N2RhYzMtZmYxNS00Y2RjLTg2MDktMmJhOTRmMwVINWEzliwidCI6IjMzYjdmNzA3LTZINmYtNDJkMi04ZDZmLTk4YmZmOWZiNWZhMCIsImMiOjR9>. Consultado el 09 de abril del 2020.

ODEPA-CIREN . 2019. Catastro frutícola. Principales resultados. Región del maule. Julio 2019. Obtenido de: https://www.odepa.gob.cl/wpcontent/uploads/2019/08/catastroMaule_2019.pdf. Consultado el 10 de diciembre de 2019.

ODEPA-CIREN. 2018. Catastro frutícola principales resultados Región de O'Higgins 2018. Obtenido de https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/08/Catastro_Ohiggins_2018.pdf. Consultado el 27 de noviembre del 2018.

Overbeck V, Schimtz M and Blanke M. 2017. Targeted forcing improves quality, nutritional and health value of sweet cherry fruit. *Journal Sci Food Agric* 97: 3649-3655.

Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem* 51: 3273-3279.

Rojas P. 2005. La vitivinicultura y su proceso de expansión en ladera en el valle de Lontué, séptima Región del Maule. Descripción de suelos de la región del maule. Memoria para optar al título de Geógrafo. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 108 p.

Salvador. 2000. Factores de precosecha que afectan la calidad. Inta Alto Valle.

Sanchez J. 2019. Comportamiento del cerezo en ambientes modificados. Boletín técnico30.POMÁCEAS. Unidad del Cerezo, Universidad de Talca, Chile.

Schmitz-Eiberger M y Blanke M. 2012. Bioactive components in forced sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.), antioxidative capacity and allergenic potential as dependent on cultivation under cover. *Food Science and Technology* 46: 388- 392.

Sekse L. 1995. Cuticular fracturing in fruits of sweet cherry (*Prunus avium* L.) resulting from changing soil water contents. *Journal Hort. Sci.* 70: 631–635.

Serra A, Duarte R, Bronze M y Duarte C. 2011. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry* 125:318–325.

Serrano M, Guilleán F, Martínez-romero D, Castillo S y Valero D. 2005. Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Sweet Cherry at Different Ripening Stages. *Agric. Food Chem* 53: 2741-2745.

Simon G. 2006. Review on rain induced fruit cracking of sweet cherries (*Prunus avium* L.), its causes and the possibilities of prevention. *Int. J. Hortic. Sci.* 12: 27-35.

Solovchenko A and Schimtz-Eiberger M. 2003. Significance of skin flavonoids for UV-B protection in apple fruits. *Journal Exp Bot* 54: 1977-1984.

Tapia C. 2017. El delicado equilibrio entre vigor y fertilidad en cerezo. *Redagricola*, Edición abril 2017. Obtenido de <https://www.redagricola.com/cl/delicado-equilibrio-vigor-fertilidad-cerezo/>. Consultado el 10 de enero de 2020.

Tapia, C. 2017. Nuevas tendencias en sistemas de conducción de cerezos. *Redagricola*, Edición abril 2017. Obtenido de <https://www.redagricola.com/cl/delicado-equilibrio-vigor-fertilidad-cerezo/>. Consultado el 10 de enero de 2020.

Tomás-Barberán F, Gil M, Cremin P, Waterhouse A, Hess-Pierce B and Kader A. 2001. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. *J Agric Food Chem.* 49: 4748-4760.

Tsao R and Yang R. 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1018: 29-40.

Usenik V, Zadavec P y Štampar F. 2009. Influence of Rain Protective Tree Covering on Sweet Cherry Fruit Quality. *Europ. J. Hort.Sci.* 74: 49–53.

Wallberg B y Sagredo K. 2014. Vegetative and reproductive development of 'Lapins' sweet cherry trees under rain protective covering. *Acta Horticulturae* 1058: 411-418.